

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Rodrigo Luiz Fabri

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Reem
Schant.) K. Schum. BIOMONITORADO PELA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E A AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
CITOTÓXICA, ANTIOXIDANTE E LEISHMANICIDA.**

Juiz de Fora, 2008.

RODRIGO LUIZ FABRI

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Reem
Schult.) K. Schum. BIOMONITORADO PELA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E A AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
CITOTÓXICA, ANTIOXIDANTE E LEISHMANICIDA.**

**Dissertação de Mestrado do Curso de
Pós-graduação em Ciências Biológicas,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas na área de Genética
e Biotecnologia.**

Orientadora: Dra. Elita Scio Fontes

Juiz de Fora, 2008.

FABRI, R.L. Estudo fitoquímico de *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum. biomonitorado pela atividade antimicrobiana e a avaliação das atividades citotóxica, antioxidante e leishmanicida. Juiz de Fora (MG), 2007. 140 f. Dissertação de Mestrado (Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora).

Esta dissertação intitulada:

“ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum. BIOMONITORADO PELA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA, LEISHMANICIDA E ANTIOXIDANTE”.

Apresentada por

RODRIGO LUIZ FABRI

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Adilson David da Silva
(Departamento de Química/UFJF)

Prof. Dra. Luciana Moreira Chedier
(Universidade Presidente Antônio Carlos/JF)

Fevereiro, 2008.

*Dedico este trabalho a meus pais,
ao meu irmão Rafael, a minha noiva Angélica
e todos meus familiares..*

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir a realização de mais um sonho.

À minha orientadora Doutora Elita Scio Fontes, muito obrigado pela oportunidade.

Aos meus pais por estarem comigo em todos os momentos.

Ao meu irmão pela força e amizade.

À minha noiva por ter me ajudado a superar mais esse desafio.

À técnica Ana Carolina Ribeiro Gomes por te me dado apoio nas atividades realizadas.

Ao aluno de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica, Mauro Nogueira Silva, pela ajuda na realização das atividades biológicas.

À enfermeira Maria Lúcia Morcef Bouzada pelo apoio durante minha jornada como graduando e pós-graduando.

Às professoras Fernanda Braga e a Doutora Elaine Coimbra do Departamento de Parasitologia da UFJF pela realização da atividade leishmanicida.

Às professoras Doutoradas Tatiana Konno e Fátima Regina Salinema pela identificação botânica da espécie em estudo.

Aos Doutores Carlos Leomar Zani e Tânia Maria de Almeida Alves do Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ pela realização da cromatografia gasosa.

A CAPES pela bolsa concedida.

À Coordenação do curso Pós-Graduação.

E a todos que me apoiaram neste trabalho.

Meditai se só as nações fortes podem fazer ciências,

Ou se a ciência as fazem fortes.

Oswaldo Cruz

RESUMO

O extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum. (Rubiaceae) e suas partições foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana frente a onze cepas de bactéria (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* sorovar *tythimurium*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus pyogenes* e *Bacillus cereus*) e duas de levedura (*Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*). A atividade leishmanicida foi testada para as formas promastigotas de *Leishmania* (*L. chagasi* e *L. amazonensis*) e a citotoxicidade avaliada pelo teste de letalidade frente a *Artemia salina*. A atividade antioxidante (ensaio com DPPH e poder de redução), a análise fitoquímica e os conteúdos de compostos fenólicos e flavonóides também foram investigados. Atividade citotóxica mais significativa foi observada para a partição hexânica ($CL_{50} = 61 \mu\text{g/ml}$); as partições AcOEt e *n*-BuOH apresentaram excelente atividade antioxidante ($CI_{50} = 7$ e $9 \mu\text{g/ml}$, respectivamente, pelo método do DPPH e $CE_{50} = 35$ e $40 \mu\text{g/ml}$, respectivamente, pelo método de avaliação do poder de redução). A atividade antioxidante que foi correlacionada positivamente com conteúdos de compostos fenólicos e de flavonóides. A partição hidrometanólica apresentou atividade expressiva para formas promastigotas de *L. amazonensis* ($CI_{50} = 9 \mu\text{g/ml}$). A partição CH_2Cl_2 mostrou intensa atividade antimicrobiana, principalmente contra *C. neoformans* e *B. cereus* com $\text{CIM} = 0,010$ e $0,020 \mu\text{g/ml}$, respectivamente e também atividade leishmanicida com $CI_{50} = 7 \mu\text{g/ml}$ para *L. chagasi*. A partição em CH_2Cl_2 foi fracionada e forneceu frações com atividade citotóxica, antimicrobiana e leishmanicida significativas. A bioautografia mostrou que triterpenos e alcalóides foram os responsáveis pela atividade antifúngica das frações. Os alcalóides extraídos apresentaram atividade antimicrobiana para *B. cereus*, *P. aeruginosa* e *C. neoformans* com $\text{CIM} = 0,039 \text{ mg/ml}$. O óleo essencial apresentou linalol e acetato de eugenol como componentes majoritários e excelente atividade antifúngica com CIM de $0,063 \text{ mg/ml}$ para *C. albicans* e de $0,008 \text{ mg/ml}$ para *C. neoformans*. Este estudo é o primeiro relato de caracterização químico-biológica de *M. frigidus*.

Palavras-Chave: Rubiaceae, *Mitracarpus frigidus*, antimicrobiano, leishmanicida, citotoxicidade, antioxidante.

ABSTRACT

The methanolic extract of the aerial parts of *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum. (Rubiaceae) and their partitions were evaluated for antimicrobial activity against eleven strains of bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* sorovar *tythimurium*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus pyogenes* e *Bacillus cereus*) and two yeasts (*Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*). Antileishmanial activity was tested for promastigotes forms of *Leishmania* (*L. chagasi* e *L. amazonensis*) and cytotoxicity was analysed by brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. Antioxidant activity (assay with DPPH and reduction power), phytochemical screening and the contents of phenolics and flavonoids were also investigated. The most significant cytotoxic activity were found for hexane partition (LC₅₀ = 61 µg/ml); the EtOAc and *n*-BuOH partitions presented excellent antioxidant activity (IC₅₀ = 7 and 9 µg/ml, respectively, by the DPPH assay and EC₅₀ = 35 and 40 µg/ml, respectively, by reduction power assay) which was positively correlated with the contents of phenolics and flavonoids. Hydromethanolic partition showed expressive activity against the promastigotes forms of *L. amazonensis* (IC₅₀ = 9 µg/ml). CH₂Cl₂ partition present an intense antimicrobial activity, mainly against *C. neoformans* e *B. cereus* with MIC = 0,010 e 0,020 µg/ml, respectively and also antileishmanial with IC₅₀ = 7 µg/ml for *L. chagasi*. The CH₂Cl₂ partition was fractionated and gave several fractions with cytotoxic, antimicrobial and antileishmanial activity. Bioautography showed that triterpenes and alkaloids were responsible for antifungal activity of the fractions. The extracted alkaloids presented antimicrobial activity against *B. cereus*, *P. aeruginosa* and *C. neoformans* with MIC = 0,039 mg/ml. The essential oil presented linalol and eugenol acetate as the major components and an excellent antifungal activity with MIC of 0,063 mg/ml for *C. albicans* and of 0,008 mg/ml for *C. neoformans*. This study is the first report of the chemical-biological characterization of *M. frigidus*.

Key-words: Rubiaceae, *Mitracarpus frigidus*, antimicrobial, antileishmanial, cytotoxicity, antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura I – Rota metabólica das principais classes de metabólitos secundários	19
Figura II - Distribuição de leishmanioses no mundo. a) leishmaniose cutânea; b) leishmaniose visceral	30
Figura III – Reação de Fenton	33
Figura IV - Formação de radicais livres e o mecanismo de ação dos antioxidantes biológicos.....	35
Figura V – Ação de antioxidantes: a) primários e b) secundários	36
Figura VI – Rota biossintética de alcalóides: a) indólicos e b) benzilisoquinolínicos	44
Figura VII – <i>Mitracarpus frigidus</i> (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum.. a) partes aéreas; b) fruto e semente	50
Figura 1 – <i>Mitracarpus frigidus</i> (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum.....	53
Figura 2 – Fluxograma da extração e partição líquido-líquido das partes aéreas de <i>M. frigidus</i>	54
Figura 3 – Cromatografia em coluna da partição CH ₂ Cl ₂ de <i>M. frigidus</i>	59
Figura 4 - Fluxograma da extração de alcalóides de <i>M. frigidus</i>	61
Figura 5 - Atividade antioxidante do extrato bruto e das partições de <i>M. frigidus</i> em diferentes concentrações pelo método do DPPH. Os valores correspondem à média de três repetições ± desvio padrão (P < 0,05)	74
Figura 6 - Poder de redução do extrato bruto e das partições de <i>M. frigidus</i> em diferentes concentrações. Os valores correspondem à média de três repetições ± desvio padrão (P < 0,05)	74
Figura 7 – Correlação entre a atividade antioxidante (ensaio com DPPH) do extrato bruto e das partições de <i>M. frigidus</i> e o conteúdo de compostos fenólicos. Os valores correspondem à média de três repetições ± desvio padrão	75
Figura 8 – Poder de redução do extrato bruto e das partições de <i>M. frigidus</i> . Os dados são apresentados como a média de três repetições ± desvio padrão	76
Figura 9 – Percentual de atividade do extrato bruto e das partições de <i>M. frigidus</i> em relação aos microrganismos testados	80
Figura 10 – ISM, índice de susceptibilidade microbiana para o extrato bruto e partições de <i>M. frigidus</i>	81
Figura 11 – ISM, índice de susceptibilidade microbiana das amostras de <i>M. frigidus</i> com CIM inferiores a 0,100 mg/ml	82
Figura 12 – Percentual de atividade antimicrobiana das amostras de <i>M. frigidus</i> com CIM inferiores a 0,100 mg/ml	82

Figura 13 - Cromatograma do extrato bruto e das partições de <i>M. frigidus</i> realizado por CLAE, nas seguintes condições: coluna de fase reversa (Zorbax SB-18; 25 cm X 4,6 cm X 5 µm); gradiente linear de solventes A (acetonitrila: água, 5:95, v/v, pH 4,0 com H ₃ PO ₄) e B (acetonitrila: água, 90:10, v/v, pH 4,0 com H ₃ PO ₄) variando de 0% a 100% de B em 30 min; fluxo de 1 ml/min; volume de injeção 10µl e a temperatura de 25°C durante a análise; detecção - 230 nm	84
Figura 14 – Percentual de atividade das frações obtidas a partir do fracionamento da partição CH ₂ Cl ₂ , em relação aos microrganismos susceptíveis (CIM inferiores a 0,100 mg/ml)	89
Figura 15 – ISM em relação às frações obtidas a partir do fracionamento da partição CH ₂ Cl ₂ (CIM inferiores a 0,100 mg/ml)	90
Figura 16 – Bioautografia do extrato bruto, partição CH ₂ Cl ₂ e das frações F ₅ , F ₆ e F _{7L} (FM: hexano:AcOEt, 40:60, v/v, revelação INP). a) <i>C. neoformans</i> e b) <i>C. albicans</i> . CCD das amostras reveladas com: c) Dragendorff e d) Liebermann-Burchard	91
Figura 17 - Cromatograma das frações de F ₅ a F ₁₆ da partição CH ₂ Cl ₂ de <i>M. frigidus</i> realizado por CLAE, nas seguintes condições: coluna de fase reversa (Zorbax SB-18; 25 cm X 4,6 cm X 5 µm); gradiente linear de solventes A (acetonitrila: água, 5:95, v/v, pH 4,0 com H ₃ PO ₄) e B (acetonitrila: água, 90:10, v/v, pH 4,0 com H ₃ PO ₄) variando de 0% a 100% de B em 30 min; fluxo de 1 ml/min; volume de injeção 10µl e a temperatura de 25°C durante a análise; detecção - 230 nm	92
Figura 18 – CCD de ppt _{MeOH} e das suas frações (FM: MeOH: ácido acético, 8:2, v/v; revelador: Reativo de Dragendorff)	96
Figura 19 - Cromatograma de ppt _{hex} , ppt _{MeOH} e da fração F _{2A} extraídas de <i>M. frigidus</i> realizado por CLAE, nas seguintes condições: coluna de fase reversa (Zorbax SB-18; 25 cm X 4,6 cm X 5 µm); gradiente linear de solventes A (acetonitrila: água, 5:95, v/v, pH 4,0 com H ₃ PO ₄) e B (acetonitrila: água, 90:10, v/v, pH 4,0 com H ₃ PO ₄) variando de 0% a 100% de B em 30 min; fluxo de 1 ml/min; volume de injeção 10µl e a temperatura de 25°C durante a análise; detecção - 230 nm	97
Figura 20 – Percentual de atividade do ppt _{MeOH} e das frações obtidas do seu fracionamento em relação aos microrganismos mais susceptíveis (CIM inferiores a 0,100 mg/ml)	101
Figura 21 – ISM, índice de susceptibilidade microbiana das amostras com CIM inferiores 0,100 mg/ml	101
Figura 22 – Perfil cromatográfico do óleo essencial das partes aéreas de <i>M. frigidus</i> por CG	102
Figura 23 – Fórmula estrutural e o espectro de massa dos constituintes presentes no óleo de <i>M. frigidus</i>	104
Figura 24 – CCD do óleo e das frações F ₆ e F _{7L} extraídas de <i>M. frigidus</i> (fase móvel: hexano:AcOEt, 60:40, v/v, revelada com ácido sulfúrico/vanilina)	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Triagem fitoquímica do extrato bruto e das partições de <i>M. frigidus</i>	71
Tabela 2 – Teores de compostos fenólicos e flavonóides do extrato bruto e das partições de <i>M. frigidus</i>	72
Tabela 3 - Atividade antioxidante e o poder de redução do extrato bruto e das partições de <i>M. frigidus</i>	73
Tabela 4 – Atividade antimicrobiana pelo método de diluição em ágar (halo de inibição) do extrato bruto e das partições de <i>M. frigidus</i>	77
Tabela 5 – Concentração inibitória mínima (CIM) e atividade total do extrato bruto e das partições de <i>M. frigidus</i>	78
Tabela 6 – Concentração mínima inibitória das amostras mais ativas (CIM inferiores 0,100 mg/ml)	81
Tabela 7 - Atividade leishmanicida e citotoxicidade do extrato bruto e das partições de <i>M. frigidus</i>	83
Tabela 8 – Peso (p/p), rendimento (% p/p) e as respectivas fases móveis em que as frações obtidas da partição CH ₂ Cl ₂ foram eluídas	86
Tabela 9 – Atividade citotóxica e leishmanicida das frações obtidas do fracionamento da partição CH ₂ Cl ₂	87
Tabela 10 – Atividade antimicrobiana das frações obtidas do fracionamento da partição CH ₂ Cl ₂	88
Tabela 11 – Atividade total (ml/g) das frações da partição CH ₂ Cl ₂ , com CIM inferior a 0,025 mg/ml	89
Tabela 12 – Constituintes presentes nas frações mais ativas da partição CH ₂ Cl ₂	95
Tabela 13 – Rendimento de ppt _{hex} , ppt _{MeOH} e as frações obtidas do seu fracionamento	98
Tabela 14 – Atividade antimicrobiana dos ppt _{hex} , ppt _{MeOH} e as frações obtidas do seu do fracionamento	99
Tabela 15 – Atividade total (ml/g) de ppt _{hex} , ppt _{MeOH} e das frações obtidas do seu do fracionamento com CIM inferiores a 0,100 mg/ml	100
Tabela 16 – Composição química do óleo essencial de <i>M. frigidus</i>	103
Tabela 17 – Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>M. frigidus</i>	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
ATCC	“American Type Culture Collection” – Coleção de Tipos de Cultura Americana
<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> -Butanol
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas
CHCl₃	Clorofórmio
CH₂Cl₂	Diclorometano
CLAE	Cromatografia líquida de Alta Eficiência
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
MeOH	Metanol
NP/PG	“Natural products reagent” – Reagente de produtos naturais
SPME	“Solid Phase Micro-Extraction” - Microextração por Fase Sólida
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
REVISÃO DE LITERATURA	18
<i>Metabolismo Vegetal</i>	18
<i>Resistência de microrganismos patogênicos aos antibióticos</i>	21
<i>Microrganismos de importância clínica</i>	24
<i>Atividade citotóxica para Artemia salina x atividade antitumoral</i>	27
<i>Aspectos gerais das Leishmanioses e tratamento</i>	28
<i>Radicais livres, espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo</i>	32
<i>Mecanismos de proteção por antioxidantes</i>	34
<i>A família Rubiaceae Juss</i>	37
<i>O gênero Mitracarpus</i>	46
<i>A espécie Mitracarpus frigidus (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum</i>	49
<i>Justificativa</i>	51
2 OBJETIVOS	52
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	52
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	52
3 METODOLOGIA	53
4 RESULTADOS	71
4.1 <i>EXTRATO BRUTO E PARTIÇÕES DE M. frigidus</i>	71
4.2 <i>FRACIONAMENTO DA PARTIÇÃO CH₂Cl₂</i>	85
4.3 <i>PERFIS CROMATOGRÁFICOS DAS FRAÇÕES ATIVAS</i>	92
4.4 <i>EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO ppt_{MeOH}</i>	95
4.5 <i>EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO ÓLEO DAS PARTES AÉREAS DE M. frigidus</i>	102

5 DISCUSSÃO	109
5.1 FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO BRUTO E PARTIÇÕES DE <i>M. frigidus</i>	109
5.2 EXTRAÇÃO DE ALCALOIDES E FRACIONAMENTO DE ppt_{MeOH}	117
5.3 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>M. frigidus</i>	118
6 CONCLUSÕES	120
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
ANEXO	141

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a frequência de resistência microbiana e a associação desta resistência com doenças infecciosas graves tem aumentado de forma progressiva (JONES, 2001). Muitos microrganismos têm desenvolvido resistência tanto contra os já bem estabelecidos antibióticos de uso convencional, quanto contra os antibióticos de última geração, causando graves problemas de saúde pública e prejuízos econômicos (AUSTIN et al., 1999; JONES, 2001; PRATES e BLOCH-JÚNIOR, 2001). Não menos importante, a leishmaniose é uma das doenças que causa sérios problemas de saúde pública na maioria dos países tropicais. O câncer, por sua vez, ocorre em todas as regiões do planeta e acomete um número cada vez maior de pessoas, sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo.

Se forem traçados paralelos entre essas doenças, um elo entre as mesmas seria, sem dúvida, as limitações em seu tratamento. Isto ocorre devido a vários problemas relacionados à toxidez, resistência ou variações de sensibilidade, além daqueles específicos a cada uma delas, como por exemplo, a não disponibilidade de uma terapia via oral no caso das leishmanioses. Também o aparecimento de muitos microrganismos resistentes aos já bem estabelecidos antibióticos de uso convencional justifica a busca constante de drogas mais eficazes, seletivas e com menos efeitos colaterais. É interessante observar que drogas ativas para essas doenças compartilham com frequência a atividade antioxidante (KANDASWAMI e MIDDLETON, 1994).

O uso de plantas medicinais para o tratamento de muitas doenças está associado à medicina popular de diferentes partes do mundo (ARAÚJO e LEON, 2001). Diferentes culturas dos mais distintos lugares, desenvolvidas ou não, conhecem e utilizam o potencial terapêutico dos vegetais no tratamento de doenças, práticas estas que acompanham o homem desde a pré-história e que evoluíram com ele ao longo dos anos (COUTINHO et al., 2004).

Na última década, a maneira de se pesquisar novos compostos biologicamente ativos sofreu grandes mudanças, principalmente devido aos avanços tecnológicos. A indústria farmacêutica tem um papel importante no desenvolvimento de novos métodos, os quais podem propiciar, de forma mais rápida, o surgimento de novos medicamentos no mercado (CORDELL, 1995).

Um dos mais importantes fatores para o sucesso no descobrimento de um fármaco novo é a diversidade química dos compostos a serem selecionados, cujas fontes podem ser compostos sintéticos, produtos naturais ou química combinatória (via biotecnologia). Entre estas possibilidades, os produtos naturais são considerados como uma das maiores fontes de diversidade química (STREGE, 1999). Dessa forma, uma das estratégias para a descoberta de novas drogas consiste na triagem de extratos naturais (plantas, fungos, bactérias, animais, organismos marinhos) em modelos biológicos adequados para a identificação de substâncias que sirvam de modelo para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos. Esta estratégia é especialmente importante para os países tropicais, que detêm a maior parte da biodiversidade do planeta. Os extratos de muitos organismos vivos são ricos em substâncias químicas produzidas pelo metabolismo especial para a comunicação intra- e inter- específica, para defesa contra infecções e ataques de predadores, proteção contra formas radicalares de oxigênio e em resposta ao estresse ambiental. Estas substâncias são denominadas produtos naturais (PNs) e apresentam grande diversidade estrutural e uma gama enorme de atividades farmacológicas (BORRIS, 1996). A maioria PNs bioativos são de baixo peso molecular (<1000 Da), o que facilita sua absorção e metabolização, tornando-os úteis como drogas para o tratamento de diversos males. Segundo Harvey (2000), a busca de PNs bioativos se constitui na estratégia de maior sucesso na descoberta de novos medicamentos.

Estima-se que existam pelo menos 250.000 diferentes espécies vegetais no planeta (VERPOORTE, 1998; HARVEY, 1999), porém menos que 10% tiveram sua atividade biológica avaliada (HARVEY, 1999).

Enquanto alguns extratos são analisados do ponto de vista da sua composição química outros têm suas atividades biológicas testadas em vários sistemas de bioensaios. Estas abordagens, quando conduzidas em separado, se constituem num fator limitante na busca de PNs bioativos, pois não correlacionam informações químicas e biológicas (KINGHORN et al., 1999). No Brasil, por exemplo, em apenas 5% das plantas estudadas, as abordagens química e farmacológica foram aplicadas de forma integrada (HARVEY, 1999).

A avaliação biológica foi uma das mais significantes mudanças na área de produtos naturais nos últimos anos. O entendimento dos mecanismos da doença, acompanhado do aumento de testes com receptores e enzimas disponíveis,

permitiram o desenvolvimento de sistemas eficientes e rápidos de bioensaios permitindo selecionar milhares de amostras em poucos dias (CORDELL, 1995).

REVISÃO DE LITERATURA

Metabolismo Vegetal

Os vegetais produzem uma grande variedade de compostos orgânicos que parecem não ter função direta sobre o seu crescimento e desenvolvimento. Tais substâncias, conhecidas como metabólitos secundários (especiais ou naturais), não apresentam efeitos diretos sobre processos celulares primários como fotossíntese, respiração, translocação de solutos e água, síntese de proteínas e assimilação de nutrientes, dentre outros. Eles diferem dos metabólitos primários (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídios) pela distribuição restrita no reino vegetal, sendo característicos de uma espécie ou de um grupo de espécies relacionadas, enquanto os metabólitos primários são de ocorrência universal (COSTA, 1978).

Os metabólitos secundários defendem os vegetais contra herbívoros e patógenos, sendo divididos em três grupos principais: os terpenos, os compostos fenólicos e os compostos nitrogenados (VICKERY e VICKERY, 1981).

Os terpenos (ou terpenóides) constituem o maior grupo de produtos secundários. As diversas classes são, em geral, insolúveis em água e sintetizadas a partir do acetil-CoA. Exemplos de terpenóides incluem as giberelinas, os carotenóides e os piretróides (ROBINSON, 1991).

Os compostos fenólicos são moléculas que contêm um grupo fenol em sua molécula. Constituem em vegetais um grupo muito heterogêneo com mais de 10.000 compostos. Alguns são solúveis somente em solventes orgânicos enquanto outros são solúveis em água, havendo alguns altamente insolúveis. Suas funções metabólicas são variadas. Duas vias metabólicas estão envolvidas na síntese dos compostos fenólicos: a via do ácido chiquímico e a via do acetato. Como exemplos de compostos fenólicos destacam-se as ligninas, as cumarinas, os flavonóides e os taninos (ROBINSON, 1991).

Os compostos nitrogenados são constituídos por uma grande variedade de metabólitos secundários contendo nitrogênio na sua estrutura. Eles incluem algumas

moléculas bem conhecidas relacionadas à defesa vegetal contra herbivoria, como os alcalóides e os glicosídeos cianogênicos. Algumas dessas moléculas são tóxicas aos humanos, embora outras possam ser utilizadas no tratamento de doenças devido a suas propriedades medicinais. Os metabólitos secundários nitrogenados são sintetizados a partir de aminoácidos do metabolismo protéico (COSTA, 1978).

A rota biossintética dos principais metabólitos secundários está representada na Figura I.

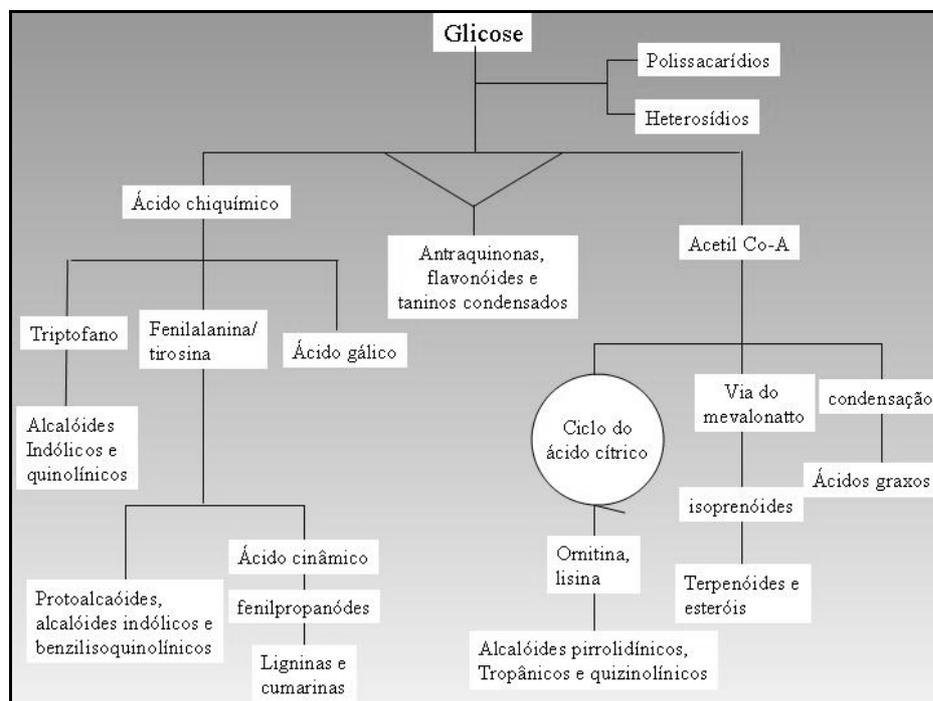


Figura I – Rota metabólica das principais classes de metabólitos secundários. Fonte: <http://br.geocities.com/plantastoxicas/rota-metabolica.html>

Óleo Essencial

Os óleos essenciais são constituídos por substâncias voláteis, como álcoois, aldeídos, ésteres, fenóis e hidrocarbonetos, extraídas de plantas aromáticas, constituindo matérias-primas de grande importância para as indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia (MARTINS et al., 2000). Estão presentes em várias partes das plantas (folhas, flores, madeiras, ramos, galhos, frutos, rizomas) sendo extraídos pelos processos de destilação a vapor, extração por solvente ou por pressão. Nem todos os óleos essenciais possuem aroma agradável ao olfato (SILVA et al., 1995).

O papel dos óleos essenciais encontrados nas plantas está relacionado com a sua volatilidade, pois agem como sinais de comunicação química com o reino vegetal e como arma contra o reino animal (MARTINS et al., 2000). Assim, considera-se a existência de funções ecológicas, especialmente como inibidores de germinação, proteção contra predadores, atração de polinizadores, proteção contra perda de água e aumento de temperatura (SILVA et al., 1995).

Grande utilização dos óleos essenciais se encontra na área de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas) e cosméticos (perfumes e produtos de higiene). Também são empregados “in natura” para a preparação de infusões e/ou sob a forma de preparação galênicas simples devidos a suas propriedades terapêuticas como calmante, antimicrobiana, digestiva, cicatrizante, entre outras (TESKE e TRENTINI, 1997).

Compostos fenólicos

Os fenólicos estão largamente distribuídos nos vegetais sendo sua presença na alimentação humana bastante significativa (SOARES, 2002). Os vegetais contêm uma grande variedade de compostos fenólicos e seus derivados, incluindo fenóis simples, fenilpropanóides, derivados do ácido benzóico, flavonóides, taninos, entre outros. Esses são essenciais ao crescimento e reprodução das plantas, atuando também como agentes de defesa contra patógenos e predadores e possuindo importante papel na pigmentação dos vegetais (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Além da capacidade antioxidante como bloqueadores dos radicais na reação em cadeia, os compostos fenólicos são capazes de eliminar o radical hidroxila, superóxido e oxigênio singlete (AROUMA, 1997; ARNAO, 2000). A inativação de radicais de oxigênio por compostos fenólicos ocorre pela formação de espécies de menor reatividade ou pela ação como doador de hidrogênio (HEIM, TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002). O potencial antioxidante de um composto fenólico depende da sua estrutura, incluindo não apenas a sua polaridade, como também a natureza e a posição dos grupos constituintes na sua estrutura (SOARES, 2002).

Alcalóides

Alcalóides são substâncias orgânicas cíclicas contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. Constituem-se num vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas. Esse grupo químico vem apresentando um grande impacto através dos tempos na medicina e em outros setores sociais e econômicos. Estão presentes em todos os grupos vegetais, apresentando distribuição restrita nas briófitas, pteridófitas e gimnospermas. Sua maior ocorrência é verificada nas angiospermas sendo encontrados em todas as partes do vegetal onde atuam na proteção contra animais, insetos, microrganismos e vírus, além de possivelmente atuarem como reserva de nitrogênio e hormônio de regulação do crescimento. O amplo espectro das atividades biológicas descrito para os alcalóides pode ser relacionado com sua variedade estrutural. Os alcalóides são divididos em diversos grupos, tais como alcalóides não heterocíclicos, pirrólicos, pirrolidínicos, piridínicos, piperidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, quinolizidínicos, quinoleínicos, isoquinoleínicos, fenantrênicos, indólicos e glioxalínicos (SIMÕES et al., 1999).

Exemplos de alcalóides farmacologicamente ativos incluem atropina (antiespasmódico e midriático), cocaína (anestésico local), morfina (analgésico), nicotina (inseticida), pilocarpina (parasimpaticomemético), sanguinarina (inibidor plaquetário dental), escapolamina (sedativo), tubocurarina (relaxante muscular), vincristina e vimblastina (antitumoral) (CORDELL, QUINN-BEATTIE e FARNSWORTH, 2001).

Resistência de microrganismos patogênicos aos antibióticos

O surgimento da resistência a antimicrobianos é um exemplo clássico de evolução em resposta a uma forte pressão seletiva. Hospitais e outros estabelecimentos constituem uma comunidade ecológica particular, na qual diversos tipos de micróbios circulam e interagem entre si diretamente, por meio da reprodução e da troca de plasmídeos e/ou indiretamente, por meio de interações

entre pacientes e funcionários (AUSTIN, KRISTINSSON e ANDERSON, 1999; PRATES e BLOCH-JÚNIOR, 2001).

Estudos feitos durante os anos de 1973 a 1994, pela Organização Européia para Pesquisa e Tratamento do Câncer, mostraram que durante o período de 1973 a 1985, bactérias Gram-negativas eram as principais causadoras de infecções em pacientes oncológicos, enquanto nos últimos anos desta análise, as bactérias Gram-positivas eram as predominantes. Esta troca na dominância de patógenos foi coincidente com a introdução, em 1985, da terceira geração de cefalosporinas, ceftazidima e ceftriaxona, e foi possivelmente causada pelo uso generalizado destas drogas (JONES, 2001). Entre as bactérias mais comumente envolvidas com resistência às drogas e infecção hospitalar estão *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella* sp, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter* sp, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli*, e em muitas delas esta resistência ocorre em função da produção de amplo espectro de β -lactamases (JONES, 2001).

A incidência de infecções fúngicas, tanto por fungos filamentosos como por leveduras, e a resistência dos mesmos às drogas também têm crescido dramaticamente nos últimos 15 anos (GEORGOPAPADAKOU e WALSH, 1994; GUPTA, KULKARNI e GANGULI, 2002).

Infecções causadas por microrganismos resistentes não atingem somente a saúde humana. Na pecuária, grandes são os problemas enfrentados pelos criadores de gado leiteiro susceptível à mastite, uma condição inflamatória da glândula mamária causada por bactérias (*S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) que acarreta mudanças nas características físicas do úbere e do leite de vaca (PRATES e BLOCH-JÚNIOR, 2001). O mesmo quadro pode ser verificado no que diz respeito aos fitopatógenos. O surgimento da resistência em fungos fitopatogênicos de importância agrônômica é considerado um fator limitante da eficácia e da vida útil das mais variadas estratégias de controle de doenças (HEANEY et al., 1994). Muitos gêneros de fungos, tais como *Aspergillus*, *Botrytis*, *Venturia*, *Ustilago*, *Marnaporte*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Cercospora*, *Cladosporium* e *Penicillium*, têm desenvolvido estratégias de resistência contra os fungicidas mais amplamente empregados, como os das classes dos benzimidazóis, das estrobilurinas, das fenoxiquinolinas e das anilinopirimidinas, sendo o uso indiscriminado destas drogas o principal fator de indução de resistência (STEFFENS, PELL e TIEN, 1996).

Espécies vegetais com atividade antimicrobiana estão amplamente distribuídas em diversas famílias vegetais como Piperaceae (LENTZ et al., 1998), Hypericaceae, Asteraceae, Caryophyllaceae, Euphorbiaceae, Fumariaceae, Gesneriaceae, Lamiaceae, Rosaceae (TAYLOR, MANANDHAR e TOWERS, 1995), Lyrthaceae, Myrtaceae, Apocynaceae, Casuarinaceae (AHMAD e BEG, 2001) entre outras.

As substâncias antimicrobianas isoladas de plantas apresentam, com raras exceções, grandes diferenças estruturais em relação aos antibióticos derivados de microrganismos. Podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente uma síntese enzimática seja em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas (SINGH e SHUKLA, 1984).

Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas incluem: terpenóides e óleos essenciais (TORSSEL, 1989); alcalóides (FESSENDEN, 1982); lectinas e polipeptídeos (TERRAS et al., 1993; ZHANG e LEWIS, 1997) e substâncias fenólicas e polifenóis, que são: fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas (STERN et al., 1996), flavonas, flavonóis e flavonóides (FESSENDEN, 1983), taninos (SCALBERT, 1991) e cumarinas (O'KENNEDY e THORNES, 1997).

Mecanismos de ação antimicrobiana para algumas dessas classes já foram descritos. Para os alcalóides, essa propriedade pode ser atribuída a sua habilidade de intercalarem com o DNA microbiano (PHILLIPSON e O'NEIL, 1989). Para os terpenóides, o mecanismo de ação ainda não está bem esclarecido, mas especula-se que estejam envolvidos na ruptura de compostos lipofílicos das membranas microbianas. Porém, Mendonza, Wilkens e Urzua (1997) mostraram que o aumento da lipofilicidade de diterpenos, por adição de grupos metil, reduziu drasticamente a atividade antimicrobiana destes compostos.

Os compostos fenólicos possuem uma relativa toxicidade a microrganismos devido à localização e ao número de grupos hidroxilas presentes nos grupamentos fenólicos, sendo que quanto maior o número de hidroxilações, maior a toxicidade (GEISSMAN, 1963). Além disso, já foi descrito que quanto maior a oxidação dos fenóis, maior seu efeito inibitório (URS e DUNLEAVY, 1975; SCALBERT, 1991). O mecanismo responsável pela toxicidade de compostos fenólicos para microrganismos inclui a inibição enzimática por compostos oxidados, possivelmente

através de reações com grupos sulfidrila ou por interações não específicas com as proteínas (MASON e WASSERMAN, 1987). Os taninos possuem a habilidade de inativar adesinas microbianas, enzimas, proteínas transportadoras de membrana, etc. Os taninos condensados podem se ligar às paredes celulares de bactérias de ruminantes, impedindo seu crescimento (JONES et al., 1994). As antraquinonas possuem anéis aromáticos com duas cetonas substituídas. Elas são ubiqüitadas *in natura* e são altamente reativas. Conhecidas como estabilizadores de radicais livres e também por complexarem irreversivelmente com aminoácidos nucleofílicos em proteínas, frequentemente conduzindo a sua inativação e perda de função. Os alvos das antraquinonas nas células microbianas são adesinas expostas a superfície, polipeptídeos da parede celular e enzimas ligadas á membrana (STERN et al., 1996). Já os flavonóides, de maneira geral, são conhecidos por serem sintetizados por plantas em resposta a infecção microbiana (DIXON, DEY e LAMB, 1983). Sua atividade é provavelmente devido à habilidade de se complexarem com as proteínas extracelulares e solúveis e com a parede celular bacteriana. Flavonóides lipofílicos podem romper a membrana microbiana (TSUCHIYA et al., 1994). Segundo CHABOT et al. (1992), flavonóides desprovidos de grupamentos hidroxila em seus β -anéis são mais ativos contra microrganismos do que aqueles hidroxilados, o que corrobora com a proposta de que o alvo antimicrobiano seja a membrana. No entanto, alguns autores se opõem a esta teoria, argumentando que quanto maior o número de hidroxilações, mais ativo serão os compostos (SATO et al., 1996).

Microrganismos de importância clínica

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva comumente encontrada em hospitais e um dos principais causadores da infecção hospitalar. A resistência dessa bactéria a antibióticos vem crescendo assustadoramente, mesmo em se tratando de drogas poderosas e de amplo espectro como a meticilina (PRATES e BLOCH-JÚNIOR, 2001).

Bacillus cereus é uma bactéria Gram-positiva contaminante de muitos alimentos podendo causar diarreia, dores abdominais, náuseas e vômitos devido à produção de enterotoxinas (GUVEN, MUTLU e AVCI, 2005).

Shigella sonnei é uma bactéria Gram-negativa causadora de shigelose, doença aguda que acomete o intestino delgado, conhecida como disenteria bacilar. Caracteriza-se por dores abdominais e cólicas, diarreia com sangue, pus ou muco; febre, vômitos e tenesmo. Em crianças, convulsões podem ser uma complicação grave. As infecções graves estão associadas a uma ulceração da mucosa, com sangramento retal e desidratação. Normalmente, é causada por precárias condições de higiene e saneamento básico sendo sua via de transmissão fecal-oral. Esta doença é mais grave em crianças e em idosos debilitados e desnutridos e em pacientes com AIDS (BENENSON, 1995).

Enterobacter cloacae é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa e causadora de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos. O trato urinário e o respiratório são os sítios de infecção mais comuns (JUANJUAN et al., 2007).

Streptococcus pyogenes tem mostrado, ao longo do tempo, alto poder de adaptação ao hospedeiro humano, atuando como importante agente etiológico de uma série de manifestações clínicas, entre as quais predominam a orofaringite, assim como seqüelas não supurativas, representadas pela febre reumática e a glomerulonefrite. A maioria das infecções causadas por esta bactéria Gram-positiva tem início nas vias aéreas superiores (faringe) ou na pele. Nas infecções da faringe, o estreptococo é, de modo geral, transmitido por meio de aerossóis e, a primeira etapa da infecção consiste em sua adesão ao epitélio da mucosa. O *S. pyogenes* tem a capacidade de invadir células de cultura de tecidos, mas não se sabe se na faringite ocorre invasão de células da mucosa faríngea. As infecções cutâneas são geralmente adquiridas por contato com pacientes portadores de piodermites e se instalam quando a pele apresenta lesões provocadas por traumas, picadas de inseto, cirurgias e por outros meios nem sempre evidentes. As infecções podem ser superficiais ou profundas, podendo ser fatais (BENENSON, 1995).

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa presente no trato gastrointestinal dos animais de sangue quente, inclusive o homem, fazendo parte da flora intestinal normal. No entanto, algumas linhagens especiais desse microrganismo podem ser patogênicas e causar doenças no homem e também em animais, recebendo a denominação genérica de *Escherichia coli* enterovirulenta (EEC). Existem quatro classes distintas de *E. coli* enterovirulenta: *E. coli* patogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli*

invasora (EIEC). Entende-se por EPEC a classe de *E. coli* pertencente a alguns sorogrupos epidemiologicamente associados a gastroenterites caracterizadas por diarreia aquosa ou sanguinolenta, que ocorrem predominantemente em crianças com menos de um ano de idade. Atualmente já existem dados indicando que adultos podem também apresentar esta síndrome. ETEC é a classe de *E.coli* associada à doença diarreica em indivíduos de todas as idades. A diarreia é consequência da ação de enterotoxinas produzidas por essas bactérias no intestino do indivíduo infectado. EHEC está associada à enterocolite hemorrágica em indivíduos de todas as idades. O mecanismo pelo qual essas bactérias causam enterocolite ainda está em estudo, embora se saiba que a síndrome é decorrente da adesão dessas bactérias às células epiteliais intestinais e consequente ação de citotoxinas produzidas no intestino do indivíduo infectado. No momento são conhecidas pelo menos duas citotoxinas diferentes. As EHEC podem causar diarreia branda e sanguinolenta (colite hemorrágica). A colite pode se agravar e causar uma síndrome muito grave, denominada síndrome urêmica hemolítica em crianças e adultos. Essa síndrome caracteriza-se por anemia hemolítica, trombocitopenia e falha renal aguda que pode se estender a outras partes do corpo, inclusive ao sistema nervoso central. A infecção causada por EIEC consiste em inflamação e necrose da mucosa do cólon (intestino grosso). Clinicamente as infecções se manifestam por diarreia sanguinolenta ou não, com a presença de leucócitos e muco, frequentemente acompanhada de dores abdominais e febre. As infecções por EIEC são mais frequentes em crianças maiores de dois anos e em adultos (TRABULSI et al., 1999).

Salmonella typhimurium é uma espécie de bactéria Gram-negativa pertencente à família Enterobacteriaceae que causa a doença chamada salmonelose. Ela se fixa na parede do intestino delgado, mais precisamente nas células M (microcílios), onde se multiplicam e se manifestam causando vômito, diarreia, náuseas, febre, anorexia intensa e cerca de 24 horas após a ingestão de alimentos contaminados (OSKAY e SARI, 2007).

Klebsiella pneumoniae é uma espécie de bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete. Pode causar pneumonia, embora seja mais comum a sua implicação em infecções hospitalares (aparelho urinário e feridas), em particular em doentes imunologicamente deprimidos (SRIKUMAR, PARTHASARATHY e SKANKAR, 2007).

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, aeróbio. As doenças causadas por *P. aeruginosa* são infecções localizadas, decorrentes de uma

contaminação oportunista. Este microrganismo pode causar infecções urinárias e respiratórias, pneumonias, meningites, endocardites e diversos outros tipos de infecção. Entretanto não há registro de gastroenterite em humanos causada por esse microrganismo. Além disso, *P. aeruginosa*, bem como outras espécies de *Pseudomonas*, apresentam grande importância para a indústria de alimentos, pois são microrganismos causadores de deterioração (SOBERON, SGARIGLIA e SAMPIETRO, 2007).

Enterococcus faecalis é uma bactéria Gram-positiva que habita o trato gastrointestinal de homens e outros mamíferos, como outras espécies do gênero *Enterococcus*. *E. faecalis* pode causar infecção pós-tratamento em humanos, especialmente em ambiente nosocomial. Os altos níveis de resistência a antibióticos naturalmente contribuem para patogenicidade de *E. faecalis*. Esta bactéria pode causar endocardites, bem como infecções na próstata, e no epidídimo. Infecções no sistema nervoso são menos comuns (DAUD, GALLO e RIERA, 2005).

Micrococcus luteus é uma bactéria saprófita Gram-positiva, pertencente à família *Micrococcaceae*. Ocorre na flora normal da pele de mamíferos e também coloniza o trato superior respiratório, orofaríngeo e mucosas humanas (KUMAR, CHAUHAN e PADH, 2006).

Candida albicans é uma levedura oportunista por excelência. Possui vários fatores que favorecem a sua implantação secundária, podendo ocorrer no decurso do diabetes, de traumatismos diversos, gravidez e, principalmente, em indivíduos imunocomprometidos pelo HIV (ZHANG et al., 2002).

Cryptococcus neoformans é uma levedura zoopatogênica cosmopolita e representa na atualidade a principal causa de meningoencefalite em hospedeiros com imunodepressão celular, cujo maior contingente é representado por indivíduos com AIDS (GUPTA, KULKARNI e GANGULI, 2002).

Atividade citotóxica para Artemia salina x atividade antitumoral

A fim de se descobrir novas substâncias bioativas, alguns modelos simples de testes biológicos têm sido utilizados. Dentre eles, o bioensaio de toxidez com *Artemia salina* (“Brine Shrimp Test” – BST) tem sido utilizado como modelo para seleção de extratos de plantas com substâncias de potencial farmacológico. Esse

microcrustáceo marinho fornece um bom modelo para estudos de bioatividade de extratos vegetais e produtos naturais devido à rapidez do seu crescimento e o baixo custo de criação e manutenção em condições de laboratório. Além disso, os resultados desse bioensaio têm demonstrado uma boa correlação com a atividade antitumoral, sendo, portanto indicado para a triagem preliminar de plantas com tal atividade. Estudos recentes mostraram que o teste de citotoxicidade contra *Artemia salina* tem uma correlação positiva com atividade para células tumorais principalmente para células KB, um carcinoma nasofarigiano humano (MACLAUGHLIN e ROGERS, 2001). Maclaughlin (1991) observou que o valor de CE_{50} para os testes de citotoxicidade para células tumorais são geralmente a décima parte da CL_{50} encontrado para o teste com este microcrustáceo.

Estudos também têm demonstrado boa correlação entre atividade contra *Artemia salina* e atividade pesticida (MCLAUGHIN e ROGERS, 2001), tripanomicida (ZANI et al., 1995) e antimaláricos (PEREZ, DÍAS e MEDINA, 1998). Recentemente, descobriu-se que esta técnica tem uma boa correlação entre as concentrações letais média (CL_{50}) de extratos de plantas para *Artemia salina* e doses letais média (DL_{50}) dos mesmos extratos, administrados oralmente em camundongos (PARRA et al., 2001).

Apenas a detecção de citotoxidez não é suficiente para atividade antitumoral ou outra qualquer, porém é um ponto de partida. Não é surpresa que substâncias isoladas a partir de procedimentos baseados na citotoxidez demonstrem efeitos deletérios para o homem, não demonstrando atividade terapêutica. Porém, toxidez ao nível celular é consistente com a previsão de atividade antitumoral, uma vez que determinada substância interfere com algum mecanismo de sobrevivência da célula, poderá também mediar uma resposta positiva no caso de células anormais (SUFFNESS e PEZZUTO, 1991). Além disso, substâncias tóxicas podem, em concentrações baixas e não tóxicas, apresentar efeitos interessantes dos pontos de vista farmacológico e terapêutico (MACLAUGHLIN, 1991).

Aspectos gerais das Leishmanioses e tratamento

A leishmaniose (ou leishmaníase ou calazar ou úlcera de Bauru) é a doença provocada pelos parasitas unicelulares do gênero *Leishmania*, que consiste em

problemas de grande importância para a saúde mundial (LAINSON e SHAW, 1992). Há três tipos de leishmaníase: visceral, que ataca os órgãos internos, cutânea, que ataca a pele, e mucocutânea, que ataca as mucosas e a pele (LEON et al., 1990). No Brasil existem as três formas, enquanto que em alguns países, como Portugal, existe principalmente a leishmaníase visceral e alguns casos (muito raros) de leishmaníase cutânea. Esta raridade é relativa, visto na realidade o que ocorre é uma subnotificação dos casos de leishmaniose cutânea. Uma razão para esta subnotificação é o fato de a maioria dos casos de leishmaniose cutânea humana serem autolimitantes. As Leishmanias são transmitidas pelos insetos fêmeas dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo). A leishmaniose também pode afectar o cão. Aliás, na Europa, este é considerado o reservatório da doença (GARCIA-GRANADOS et al., 1997).

As Leishmanias são protozoários, que são parasitas de células fagocitárias de mamíferos, especialmente de macrófagos. São capazes de resistir à destruição após a fagocitose. As formas promastigotas (infectiosas) são alongadas e possuem um flagelo locomotor anterior, que utilizam nas fases extracelulares do seu ciclo de vida. A forma amastigota (intra-celular) não tem flagelo (DESJEUX, 1996).

Segundo Shaw (1994), há catorze espécies patogênicas para o ser humano. As mais importantes são:

- As espécies *L. donovani*, *L. infantum*, e *L. chagasi* que podem produzir a leishmaniose visceral, mas, em casos leves, apenas manifestações cutâneas.
- As espécies *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. peruviana* que produzem a leishmaniose cutânea ou a mais grave, mucocutânea.

O ciclo de vida das espécies é ligeiramente diferente mas há pontos comuns. São libertados no sangue pela picada de dois gêneros atípicos de mosquitos: *Lutzomyia* e *Phlebotomus*. As Leishmanias na forma de promastigotas ligam-se por receptores específicos aos macrófagos, pelos quais são fagocitadas. Elas são imunes aos ácidos e enzimas dos lisossomas com que os macrófagos tentam digerir-las, e transformam-se nas formas amastigotas após algumas horas (cerca de 12h). Então começam a multiplicar-se por divisão binária, saindo para o sangue ou linfa por exocitose e por fim conduzem à destruição da célula, invadindo mais macrófagos. As formas amastigotas ingeridos pelos insetos transmissores demoram oito dias ou mais a transformarem-se em promastigotas e multiplicarem-se no seu

intestino, migrando depois para as probóscides (HAMMARTON, MONTRAM e DOERING, 2003).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a Leishmaniose acomete 350 milhões de pessoas em 88 países no mundo, com 2 milhões de novos casos a cada ano e estima-se que cerca de 1/3 da população corra o risco de contrair a doença (Figura II). Por esta razão tem sido considerada como uma das seis principais doenças tropicais infecciosas (WHO, 2003).

No Brasil, de acordo com os dados do Ministério da Saúde/Fundação Nacional da Saúde (MS/FUNASA, 2005) a leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta uma taxa de incidência de 14,12 casos por 100.000 habitantes e a leishmaniose visceral (LV) apresenta uma taxa de 1,89 casos por 100.000 habitantes, sendo que em 2002, houve 26.014 casos de LTA e 3.481 de LV. O aumento da incidência da LTA e LV associada a altas taxas de mortalidade e a expansão de formas de leishmaniose para novas áreas geográficas, constitui um sério problema de saúde pública no Brasil.

a)





Figura II - Distribuição de leishmanioses no mundo. a) leishmaniose cutânea; b) leishmaniose visceral. Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2003.

Os indivíduos com leishmanioses são submetidos ao tratamento, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (MS/Guia de Vigilância Epidemiológica, 1998; MS/FUNASA, 2005). Desde a introdução do tártaro emético (antimonial trivalente) na terapia de LTA, por Gaspar Vianna em 1912 (PASSOS, 1998), o tratamento desta doença pouco evoluiu, havendo apenas a substituição do antimonial trivalente pelo pentavalente, inicialmente utilizado por Bramachari em 1920 (MARSDEN, 1985). Os antimoniais pentavalentes continuam sendo os medicamentos indicados para o tratamento de todas as leishmanioses. O tratamento é longo, caro, a via de administração é intra-muscular, está relacionado a vários efeitos colaterais e é contra-indicado em grávidas, nefropatas, cardiopatas, pacientes com Doença de Chagas e tuberculose. A resposta ao tratamento com os antimoniais varia consideravelmente dependendo da cepa do parasita envolvida, *status* da resposta imune do paciente e da forma clínica ou do estágio da doença (GRIMALDI e TESH, 1993). Um dos grandes problemas encontrados na terapêutica com os antimoniais é a variedade de esquemas descritos na literatura, além dos problemas de resistência na LV e recidiva na LTA, nas formas mucosa e mucocutânea (MARSDEN, 1985).

Os fármacos utilizados como segunda escolha para o tratamento das leishmanioses são a anfotericina B e a pentamidina, nos casos de falha terapêutica pelo antimonial. No entanto, o uso dessas drogas deve ser feito sob vigilância, em serviços especializados e com o paciente hospitalizado (MS/Guia de Vigilância Epidemiológica, 1998). Outras drogas tais como paramomicina, alopurinol e cetoconazol também são utilizadas como terapia coadjuvante, associadas ou não

àquelas descritas anteriormente (GRIMALDI e TESH, 1993). Alternativamente, imunoterapia ou em associação com a quimioterapia tem se mostrado promissora (GENARO et al., 1996).

Há uma forte correlação entre atividade antioxidante e o efeito tóxico de substâncias sobre espécies de parasitos intracelulares. Essa propriedade química é observada, por exemplo, em antimaláricos tradicionais, assim como nas substâncias antimaláricas recentemente isoladas de plantas (KANDASWAMI e MIDDLETON, 1994).

Uma hipótese plausível então é que drogas leishmanicidas possam ser encontradas entre produtos naturais antioxidantes, tais como taninos gálicos, taninos condensados, proantocianidinas e flavonóides (TASDEMIR et al., 2006).

Compostos químicos, isolados de extratos vegetais, demonstraram eficácia comprovada na atividade leishmanicida *in vitro* sobre formas promastigotas e/ou amastigotas de *Leishmania*. Dentre eles, podem ser citados os terpenóides (CAMACHO et al., 2000), aminoglicosteróides e aminosteróides (KAM et al., 1997), naftoquinonas (FOURNET et al., 1992), chalconas (CHEN et al., 1993), glicosídeos iridóides (MITTAL et al., 1998), flavonóides (ARAÚJO, ALEGRIO e LEON, 1998) e alcalóides (QUEIROZ et al., 1996).

Radicais livres, espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

Radical livre refere-se a qualquer espécie química capaz de existir independentemente de outras espécies (por isso o termo “livre”), e que possui um ou mais elétrons não pareados (HALLIWELL, 1994).

“Espécies reativas de oxigênio” (EROs) é o termo utilizado para a inclusão, não só dos radicais livres contendo oxigênio ($O_2^{\cdot-}$), como também dos derivados de oxigênio não radicais (HALLIWELL, 1994), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ozônio (O_3).

A formação de oxigênio singlete (1O_2) em sistemas biológicos tem sido amplamente demonstrada e relacionada com processos celulares diversos tais como o mecanismo de defesa contra vírus e bactérias promovido por células fagocitárias. Os possíveis mecanismos de formação desta espécie em sistemas biológicos incluem reações de quimioexcitação catalisadas por peroxidases (mieloperoxidase)

ou oxigenases (lipooxigenase ou ciclooxigenase); a reação de peróxido de hidrogênio com hipoclorito ou peroxinitrito; termodecomposição de dioxietanos, entre outras. O $^1\text{O}_2$ apresenta alta reatividade, oxidando facilmente muitos compostos orgânicos ricos em elétrons, como sulfetos, aminas e fenóis. Sendo assim, moléculas fundamentais como ácidos graxos insaturados, proteínas e DNA são importantes alvos biológicos do $^1\text{O}_2$ (JAMIESON, 1989).

O oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) pode reagir com outras moléculas para dar origem a EROs, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-) e radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) (BORG, 1993).

O ânion superóxido é gerado pela redução tetravalente do oxigênio molecular e água. Este radical pode ser formado em células aeróbicas, durante o processo de respiração (na cadeia respiratória de elétrons) e é um importante fator que auxilia os fagócitos no processo de destruição de bactérias. Em seres vivos, o radical superóxido é removido por enzimas chamadas superóxido dismutase (SOD) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formado pela redução tetravalente do O_2 a H_2O e dismutação do O_2^- , não é um radical livre, mas um agente oxidante. Na presença do superóxido e íons metálicos de transição, o H_2O_2 pode gerar $\text{OH}\cdot$ pela reação de Fenton (Figura III). O $\text{OH}\cdot$, formado por esta reação e pela redução tetravalente do oxigênio molecular é altamente reativo causando danos ao DNA e dando início ao processo de peroxidação lipídica (PACKER e GLAZER, 1990).

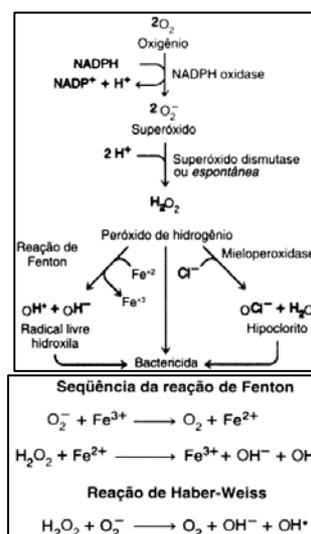


Figura III – Reação de Fenton. Fonte: <http://www.geocities.com/bioquimicaplicada/Radicaislivres.htm>

Os ácidos graxos são susceptíveis ao ataque por EROs; portanto, qualquer reação ou processo que origine EROs pode definitivamente estimular a peroxidação lipídica. O seqüestro de hidrogênio é mais fácil em ácidos graxos insaturados do que em seus semelhantes saturados, o que torna mais susceptíveis ao ataque das EROs (PACKER e GLAZER, 1990).

A produção de EROs é uma consequência normal de uma série de reações bioquímicas essenciais ao organismo e resulta em danos biológicos apenas quando essa produção torna-se anormalmente elevada e/ou quando as defesas antioxidantes estão diminuídas (HALLIWELL, 1994).

O estresse oxidativo do organismo pode ser compreendido como a condição na qual a produção de EROs está aumentada ou quando as defesas antioxidantes naturais normais estão diminuídas, levando a uma alteração no equilíbrio oxidantes/antioxidantes e, conseqüentemente, ao dano potencial da modificação oxidativa. Tal situação parece ser mais freqüente devido à síntese elevada de EROs (HALLIWELL, 1994), embora existam evidências demonstrando que as defesas antioxidantes não são estáticas, podendo ser induzidas em situação de estresse. A correlação entre o estresse oxidativo e vários distúrbios no organismo, como doenças autoimunes, doenças neurodegenerativas (ZANA, JANKA e KÁLMÁN, 2006), câncer, diabetes, cardiopatias, doenças cardiovasculares dentre outras, tem sido proposta (FREI, 1999).

Mecanismos de proteção por antioxidantes

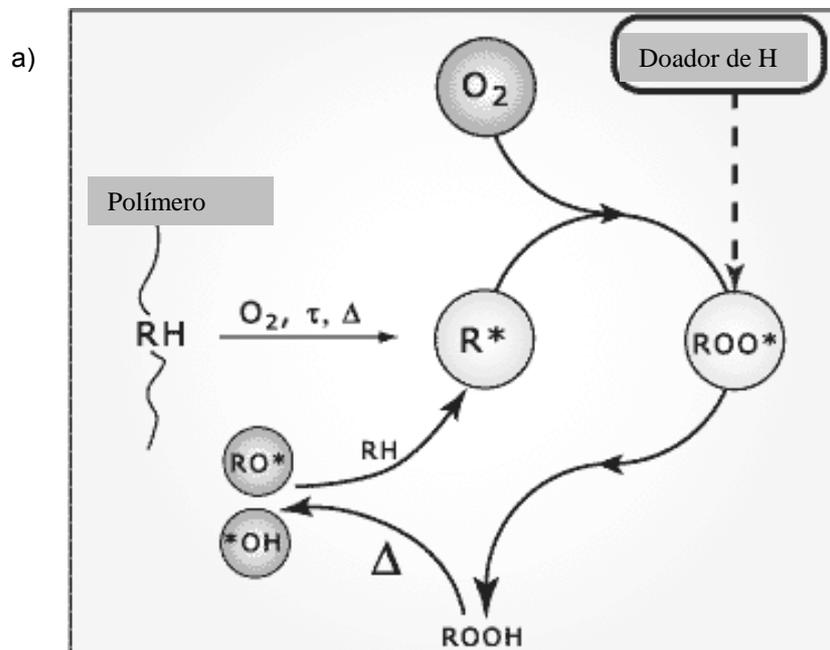
Os antioxidantes podem ser compreendidos como substâncias que, quando presentes, em baixas concentrações comparadas ao substrato oxidável, retardam ou inibem significativamente a oxidação desse substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; HALLIWELL, 1990). Essa inibição ou diminuição na velocidade de reação ocorre por ação nas diferentes etapas do processo de oxidação, atuando sobre diversos substratos, desde uma molécula simples a polímeros e biosistemas complexos (HALLIWELL et al., 1995).

Os antioxidantes com efeito preventivo, classificados como primários, podem atuar evitando a iniciação pela captação de radicais iniciadores ($R\cdot$), agindo como doadores de H^+ ou de elétrons (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989) (Figura IVa).

Entre esses compostos incluem-se antioxidantes sintéticos, carotenóides, tocoferóis, compostos fenólicos e alguns aminoácidos (SELLAPPAN, AROH e KREMER, 2002). Podem agir também como queladores de metais, ação proposta para alguns aminoácidos, ácido nítrico, EDTA e compostos fenólicos (ZHENG e WANG, 2001).

Os antioxidantes também podem agir na decomposição de peróxidos, convertendo-os à forma inativa por ação de agentes redutores, bloqueando a reação em cadeia, por meio da captação de intermediários reativos como radicais peroxila e alcóxila. Esses são os antioxidantes secundários (Figura IVb). Os compostos fenólicos, antioxidantes sintéticos, vitaminas A e E, aminas, grupamentos tiol e dissulfetos são capazes de agir sobre peróxidos, evitando propagação da reação de oxidação (NAMIKI, 1990).

A Figura V mostra, em resumo, a formação de radicais livres e o mecanismo de ação dos antioxidantes biológicos.



b)

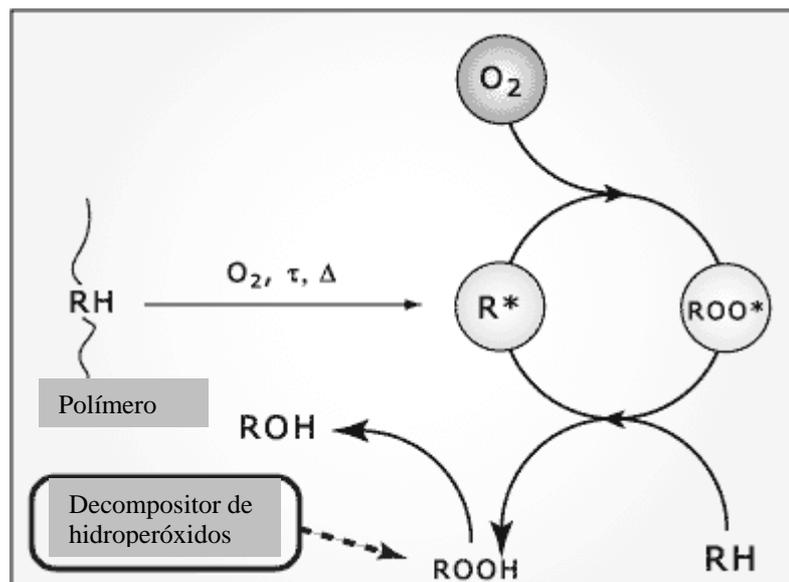


Figura IV – Ação de antioxidantes: a) primários e b) secundários.

Fonte: <http://www.specialchem4adhesives.com/tc/antioxidants>

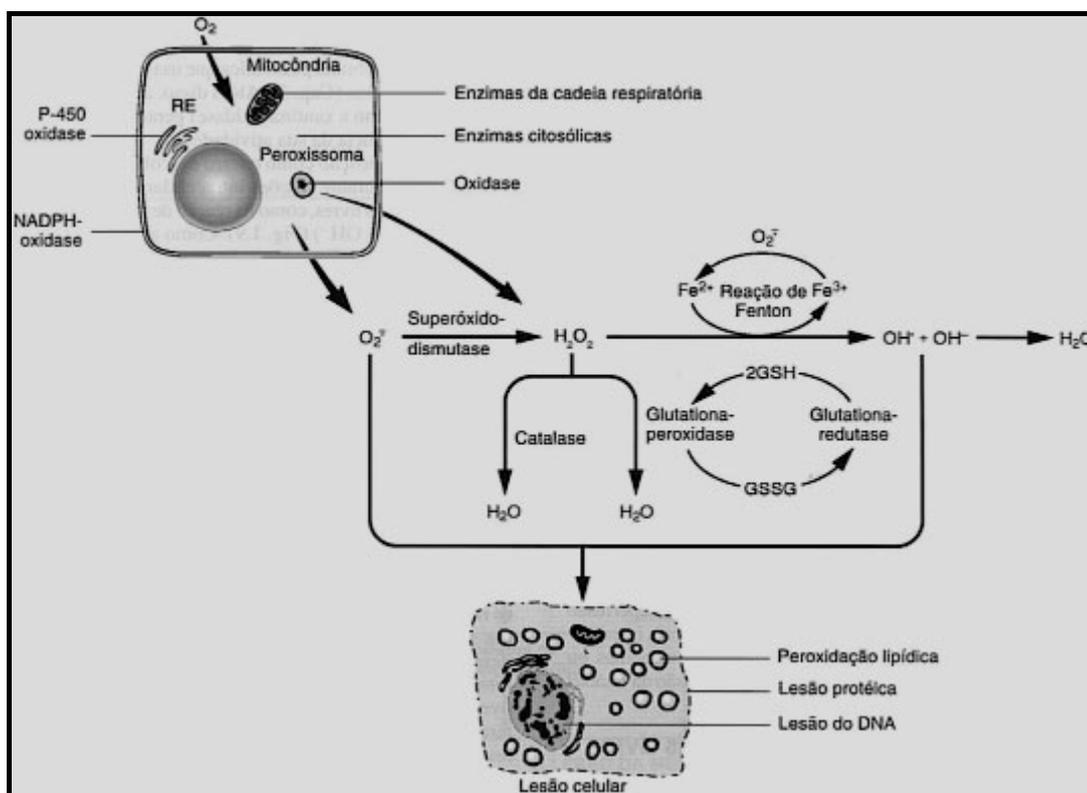


Figura V - Formação de radicais livres e o mecanismo de ação dos antioxidantes biológicos.

Fonte: <http://www.quimica.fe.usp.br/global/ca8/radical.htm>

A família Rubiaceae Juss.

Taxonomia

Rubiaceae é uma família botânica, pertencente às angiospermas, de grande importância para a sociedade, pois nela encontra-se o café (*Coffea arábica* L.), que produz uma das bebidas mais consumidas no mundo, espécies ornamentais (ixora, gardênia, pentas, mussaendas), espécies invasoras (poaias, mata-pasto) e algumas medicinais; freqüentemente causam intoxicações no gado, pois várias espécies dessa família são tóxicas (ixora, erva-de-rato etc). Caracteriza-se por possuir folhas simples, opostas ou verticiladas, com estípulas interpeciolas o que caracteriza a família. Pode ser de porte arbóreo, arbusto, subarbusto ou ervas perenes ou anuais, menos freqüentemente lianas. As espécies são de ampla distribuição geográfica, mas concentram-se nas regiões tropicais; com flores andróginas, raramente unissexuais, gamopétalas, em geral pentâmeras; androceu com 4 a 5 estames, anteras geralmente rimosas; ovário ínfero, formado de 2 ou mais carpelos, contendo 2 ou mais lóculos, tendo em geral, um óvulo por lóculo; fruto do tipo baga, cápsula ou drupa, às vezes seco e indeiscente ou ainda esquizocárpico (carpelos separados na maturação); sementes com cotilédones espatulados ou lineares, embrião reto, endosperma abundante e oleoso, raro, pouco ou ausente (SOUZA e LORENZI, 2005).

A família Rubiaceae possui aproximadamente 637 gêneros e cerca de 10.070 espécies (ROBBRECHT, 1988), distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, atingindo, porém, as regiões temperadas e frias da Europa e norte do Canadá (JUDD et al., 1999). De acordo com a classificação de Robbrecht (1998), está dividida em quatro subfamílias, as quais incluem 39 tribos. No Brasil, está representada por 18 tribos, 101 gêneros e 1.010 espécies, distribuídas por diversas formações vegetacionais e apresentando grande ocorrência na Mata Atlântica (BARROSO et al., 1991). Dentre os gêneros pertencentes a essa família, encontra-se *Mitracarpus* Zucc.

Constituintes químicos

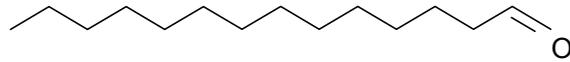
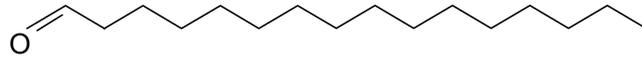
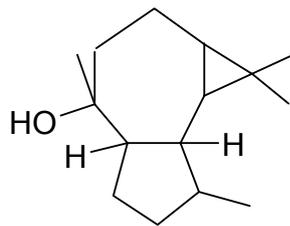
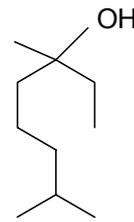
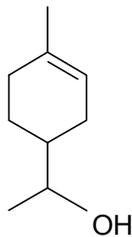
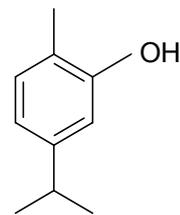
A família *Rubiaceae* apresenta uma vasta diversidade de constituintes químicos já isolados pertencentes às seguintes classes: antraquinonas e naftoquinonas (KAMIYA et al., 2005; SANG e HO, 2006; SIDDIQUI et al., 2006), iridóides glicosídicos (ONO et al., 2005; GUVENALP et al., 2006), secoiridóides glicosídicos (KITAGAWA et al., 1996), bisiridóides glicosídicos (DINDA et al., 2006), glicosídeos cianogênicos (ROCKENBACH, NAHRSTEDT e WRAY, 1992), saponinas terpênicas (ZHAO et al., 1997), triterpenos (MUKHERGEE et al., 2004), óleo essencial (NAVAE, MIRZA e DIN, 2006), alcalóides indólicos (ACHENBACH et al., 1995; SAKAI, 1995; TAKAYAMA, AIMI e SAKAY, 2000), alcalóides oxindólicos (LIU e FENG, 1993) e alcalóides tetrahydroisoquinólicos monoterpênicos glicosilados (ITOH et al., 1994).

Óleos essenciais presentes em espécies de Rubiaceae

Navae, Mirza e Din (2006) identificaram a composição química do óleo essencial das partes aéreas de *Rubia tinctorum* L. identificando como constituintes majoritários pentadecanal, tridecanal e globulol.

A espécie *Randia matudae* Lorence & Dwyer teve seus constituintes identificados, no óleo essencial das inflorescências, tendo como componentes mais abundantes linalol, benzilálcool, transmetil isoeugenol, alfa-terpineol (SETZER, NOLETTO e LAWTON, 2006).

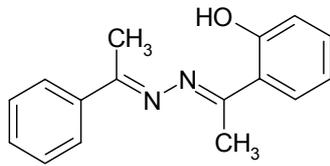
Baser et al. (2004) analisou os óleos essenciais das partes aéreas de duas espécies de *Galium* L., *Galium aparine* L. e *Galium odoratum* (L.) Scop., identificando 72 e 96 constituintes respectivamente, sendo que os componentes majoritários foram ácido hexadecanóico para *G. aparine* e timol e isotimol para *G. odoratum*.

**Pentadecanal****Tridecanal****Globulol****Linalol** **α -Terpineol****Timol**

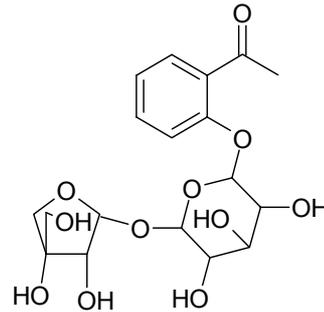
Compostos fenólicos presentes em espécies de Rubiaceae

Muitas propriedades das plantas estão associadas com a presença, tipo e conteúdo de seus compostos fenólicos. Por esta razão, vários métodos de análise de diferentes classes de fenólicos e polifenólicos têm sido recentemente realizados. Estudos recentes mostraram a atividade antioxidante de extratos de várias espécies da família *Rubiaceae*, tais como *Randia echinocarpa* Moc & Sesse (fruto) (SANTOS-CERVANTES et al., 2007), *Morinda citrifolia* L. (fruto) (CHAN-BLANCO et al., 2007), *Uncaria tomentosa* Will D.C. (casca) (PILARSKI et al., 2006), *Galium verum* L. (folha) (MAVI et al., 2004), *Mitracarpus scaber* Zucc. (parte aérea) (GERMANO et al., 1999) e sua correlação com a presença de compostos fenólicos.

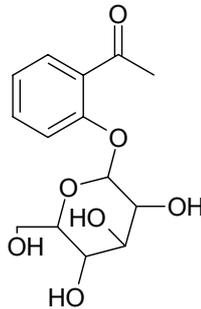
Lendl et al. (2005) estudaram o extrato das raízes e do caule de *Chione venosa* (Sw.) e identificaram três derivados acetofenonas, O-hidroxi-D-glicopiranosídeo, acetofenona-2-O-[β-D-apiofuranosil-(1'' → 6')-O-β-glicopiranosídeo] e acetofenona-2-O-β-glicopiranosídeo e alguns compostos fenólicos e terpenóides como α-morronisídeo, swerosídeo, diderrosídeo, daucosterol, β-sitosterol.



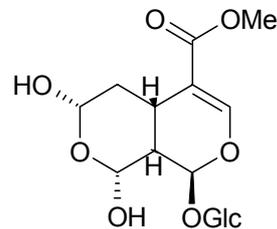
O-Hidroxi-D-glicopiranosídeo



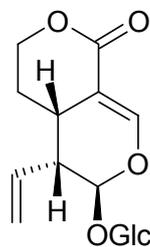
Acetofenona-2-O-[β-D-apiofuranosil-(1'' → 6')-O-β-glicopiranosídeo]



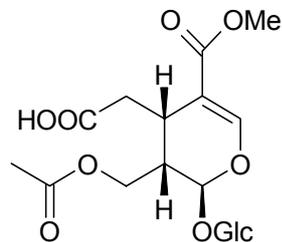
Acetofenona-2-O-β-glicopiranosídeo



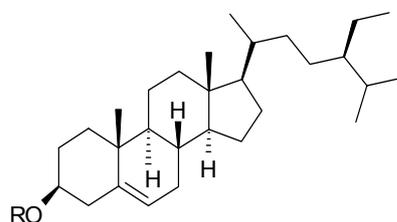
α-Morrosídeo



Swerosídeo



Diderrosídeo



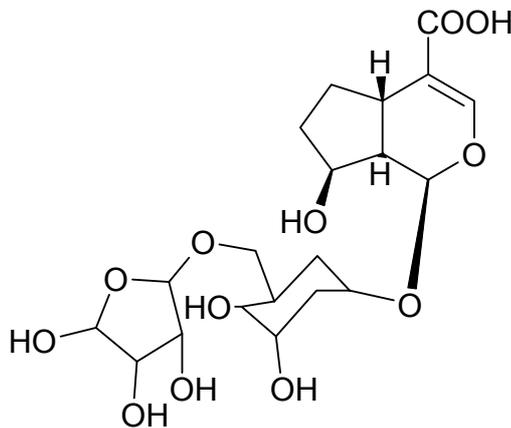
Daucosterol – R = Glicose

β-Sitosterol – R = H.

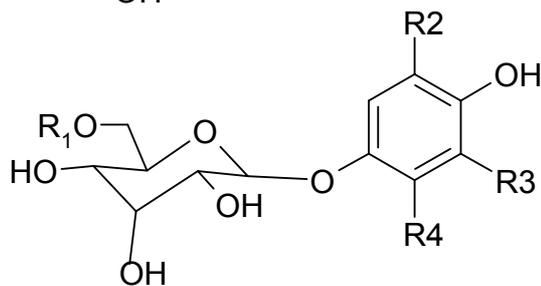
Zin et al. (2007), isolaram flavonóides com alta atividade antioxidante quando comparados a BHT e α -tocoferol. Os flavonóides majoritários detectados no extrato metanólico dos frutos de *M. citrifolia* foram dos tipos catequinas e isocatequinas.

Kitagawa et al. (1996) isolaram um glicosídeo secoiridóide (3'-O-cafeoilswerosídeo) e dois apioglicosídeos fenólicos, quelampaiosídeo A e B, do caule de *Anthocephalus chinensis* (Lam.) A. Rich. ex Walp, uma planta medicinal da Indonésia.

Um glicosídeo iridóide, ácido mussaenosídico 6-O- β -D-apiofuranosil, e quatro diglicosídeos fenólicos, cantosídeos 1-4, das partes aéreas de *Canthum berberidifolium* Geddes foram isolados por Kanchanapoom, Kasai e Yamasaki (2002).



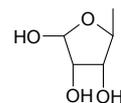
Ácido mussaenosídico 6-O- β -D-apiofuranosil



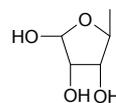
1-Cantosídeo

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
H	OMe	OMe	H
	OMe	OMe	H
	H	OMe	H
	H	H	OMe

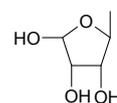
2-Cantosídeo



3-Cantosídeo



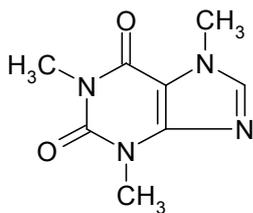
4-Cantosídeo



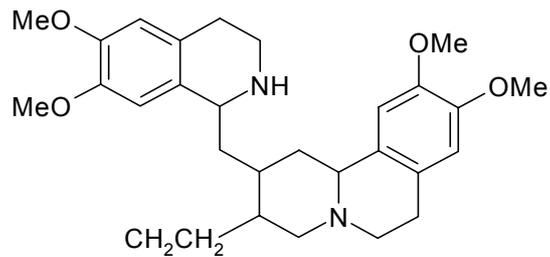
Alcalóides representativos da família Rubiaceae

De acordo com Cordell, Quinn-Beattie e Farnsworth (2001) a família *Rubiaceae* possui cerca de 677 alcalóides já isolados e destes, mais da metade, 391, são alcalóides indólicos e benzilisoquinolínicos.

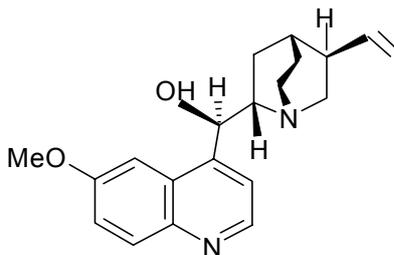
Os alcalóides da família *Rubiaceae* possuem grande importância farmacológica, como por exemplo: a cafeína, isolada de *Coffea arabica* L. (estimulante do Sistema Nervoso Central); a emetina, isolada de *Cephaelis ipecacuanha* Richaud. (amebecida e emético); a quinina e quinidina, isoladas de *Cinchona ledgeriana* Moens. ex Trimen (antimalárico e antiarrítmico, respectivamente) (CORDELL, QUINN-BEATTIE e FARNSWORTH, 2001).



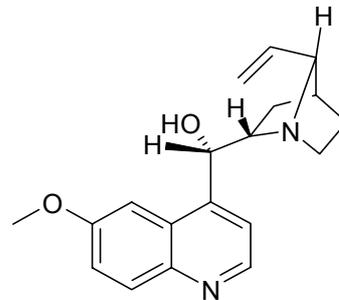
Cafeína



Emetina



Quinina



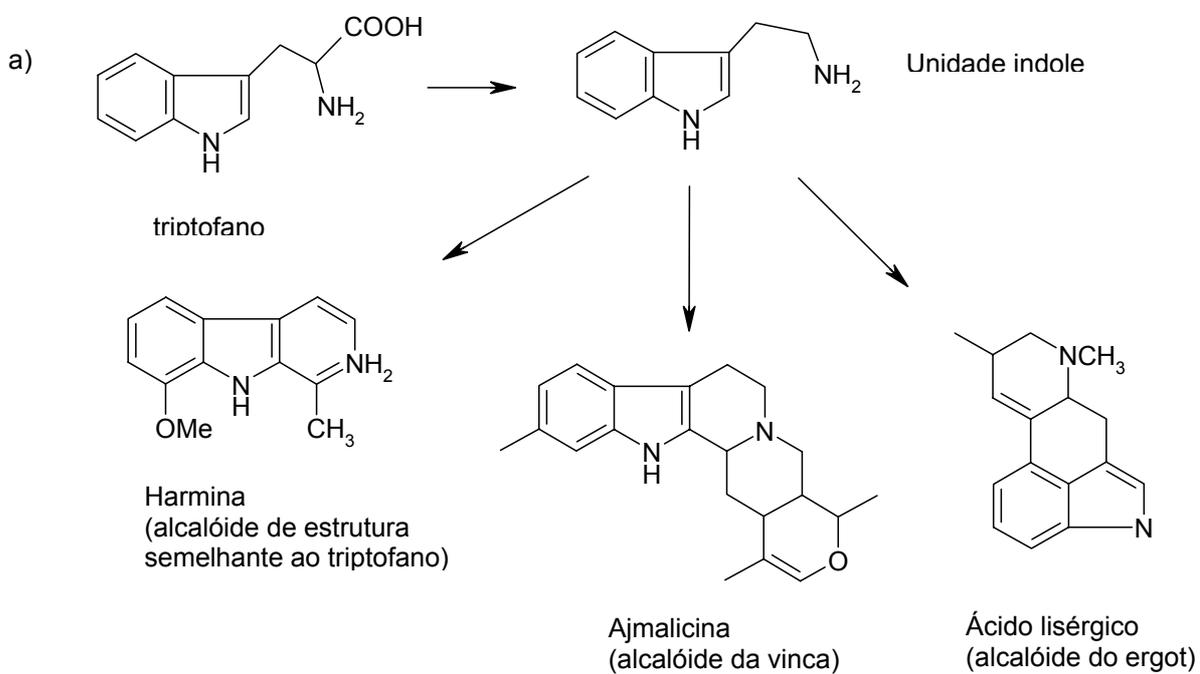
Quinidina

Biossíntese e atividades biológicas de alcalóides indólicos e benzilisoquinolínicos

Os alcalóides indólicos são subdivididos em dois grupos: um maior conhecido como indólicos monoterpênicos e um outro com os demais alcalóides indólicos. Os primeiros são, na maioria das vezes, derivados da triptamina, oriunda do aminoácido

aromático L-triptofano e do monoterpene iridóide secologanina. O grupo menor é muito heterogêneo e com isso tem ocorrência dispersa e menos caracterizada do ponto de vista quimiosistemático (SIMÕES et al., 1999) (Figura VIa).

Já os alcalóides benzilisoquinólicos são derivados do aminoácido aromático tirosina. O esqueleto 1-benzilisoquinólico resulta da união de duas moléculas de tirosina (SIMÕES et al., 1999) (Figura VIb).



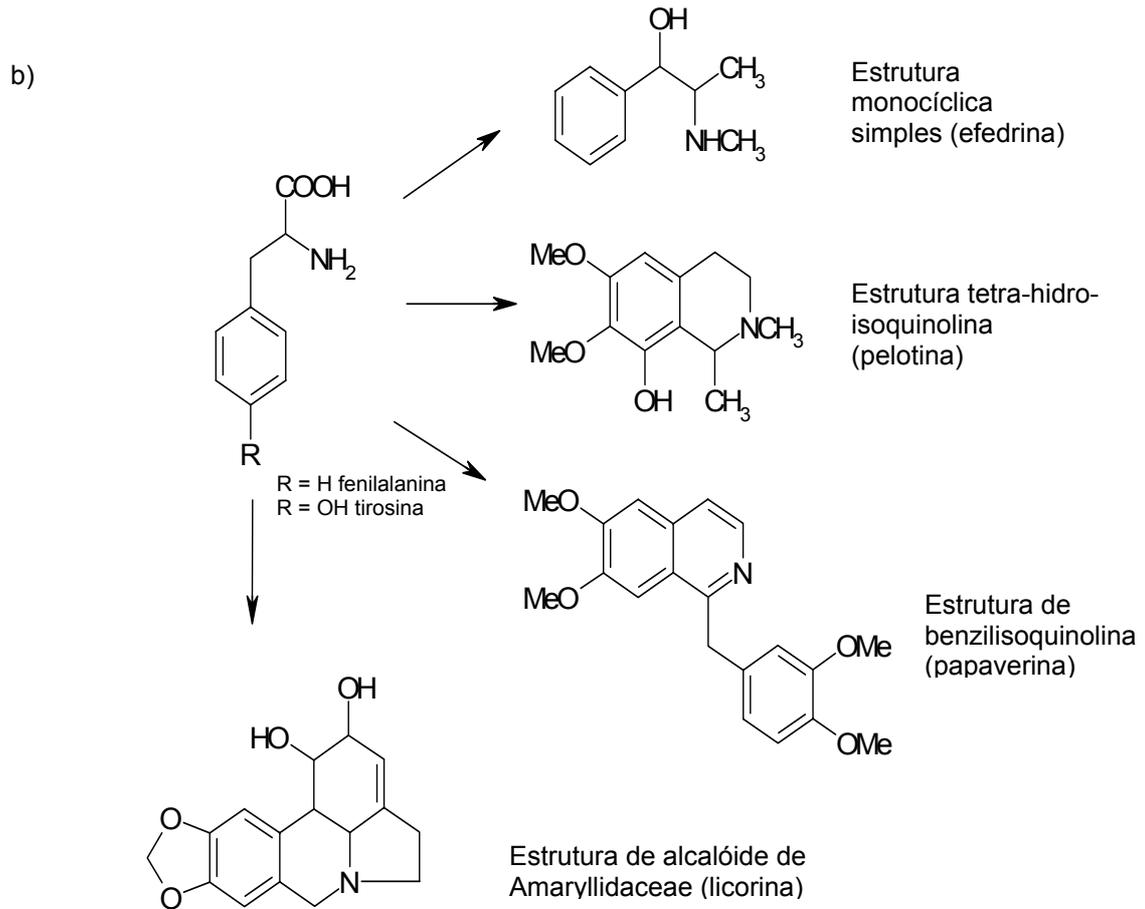
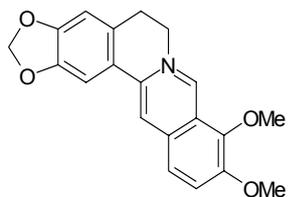


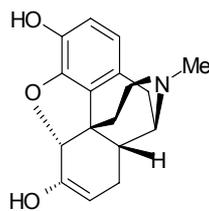
Figura VI – Rota biossintética de alcalóides: a) indólicos e b) benzilisoquinolínicos.
Fonte: DEWICH, 2002.

Os alcalóides indólicos e benzilisoquinolínicos apresentam uma extensa atividade biológica. Já foram isolados mais de 3500 alcalóides da classe indólica e benzilisoquinolínica (CORDELL, QUINN-BEATTIE e FARNSWORTH, 2001).

Entre os alcalóides de importância farmacológica, encontram-se: a) indólicos: quinina, vimblastina, vincristina, ioimbina, ajmalicina (antimicrobiano), estriquinina (estimulante do sistema nervoso central) e vincamina (estimulante cerebral); b) benzilisoquinolínicos: berberina (age contra infecções oculares), codeína (analgésico e antitussígeno), sanguinarina, papaverina (relaxante muscular), noscapina (antitussígeno) (CORDELL, QUINN-BEATTIE e FARNSWORTH, 2001).

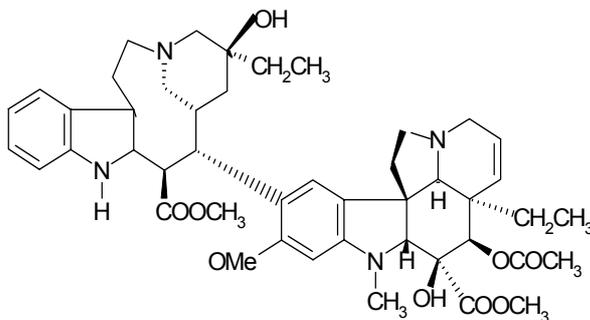


Berberina

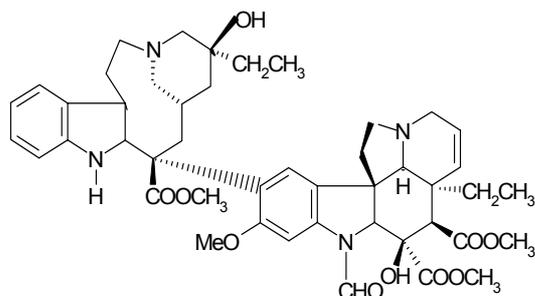


Papaverina

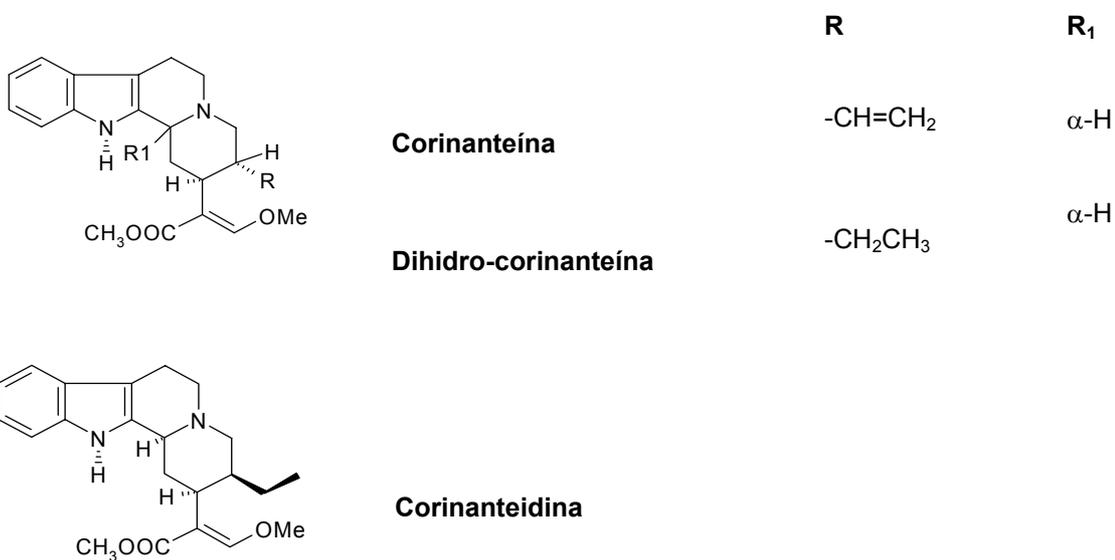
Vinblastina



Vincristina



Staerk et al. (2000) isolaram cinco alcalóides indólicos obtidos da casca de *Corynanthe pachyceras* K. Schum com atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania major*. Entre estes alcalóides destacam-se dihidro-corinanteína, corinanteína e corinanteidina, com valores de IC_{50} abaixo de $3 \mu M$.



Corinanteína

Dihidro-corinanteína

Corinanteidina

O gênero *Mitracarpus*

Classificação botânica

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem Gentianales

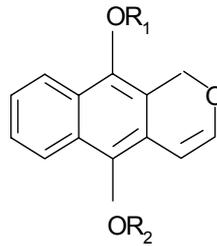
Família: Rubiaceae

Gênero: *Mitracarpus*

O gênero *Mitracarpus* é nativo do Brasil sendo encontrado principalmente nos países tropicais e subtropicais. As espécies de *Mitracarpus* se diferenciam principalmente pela ornamentação do tegumento da semente e indumento do caule. Exemplos incluem *M. longicalyx* E.B. Souza & M.F. Sales (tegumento da face ventral da semente com depressão em forma de “x” que se alonga na fase dorsal em duas depressões semi-circulares; indumento do caule viloso a grabrescente) e *M. frigidus* (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum (depressão em forma de “y” na vista ventral e a face dorsal lisa, indumento hípido) (PEREIRA, CARVALHO-OKANO e GARCIA, 2006).

Algumas espécies de *Mitracarpus* possuem o uso etnofarmacológico relatado, destacando *M. scaber* que é empregada extensamente na medicina tradicional da África ocidental para dor de cabeça, dor de dente, amenorréia, dispepsia, doenças hepáticas, doenças venéreas e leprosas. O suco da planta é aplicado topicamente para o tratamento dermatológico (DALZIEL, 1936; KERHARO e ADAM, 1974).

Moulis et al. (1992) relataram o isolamento do harounosídeo, uma hidroquinona pentalongina glicosilada das partes aéreas frescas de *M. scaber* que demonstrou uma potente atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Trichophytum soudanense*.

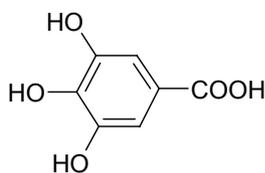


$R_1 = R_2 = \text{Glicose.}$

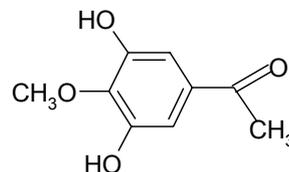
Harounosídeo

Outro estudo (SANOGO et al., 1996) também mostrou que o extrato em éter dietílico das partes aéreas de *M. scaber* exibiu um amplo espectro antibacteriano e antifúngico contra cepas padrões e isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e de *C. albicans* responsáveis por infecções comuns da pele. Mais recentemente, Germano et al. (1999) relataram o efeito hepatoprotetor do decoto dessa espécie na hepatotoxicidade induzida por CCl_4 *in vivo* assim como *in vitro* usando hepatócitos isolados.

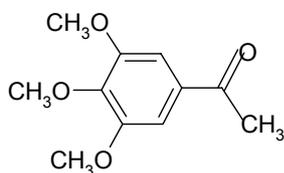
Já se tem conhecimento de alguns compostos presentes em *M. scaber*, como psolareno; rutina; campferol-3-o-rutinosídeo; ácido gálico; ácido 3,4,5-trimetoxi benzóico; 4-metoxiacetofenona e 3,4,5-trimetoxiacetofenona. Destes, o ácido gálico e o 3,4,5-trimetoxiacetofenona apresentaram atividade antimicrobiana com CIM = 3,90 e 0,97 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente contra as cepas de *S. aureus* (BISIGNANO et al., 2000). Dois ácidos triterpênicos isoméricos foram identificados nesta espécie, o ácido oleanólico e o ursólico e foi observada a atividade antimicrobiana para *Dermatophilus congolensis* (GBAGUIDI et al., 2005).



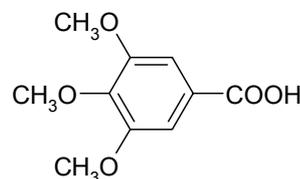
Ácido gálico



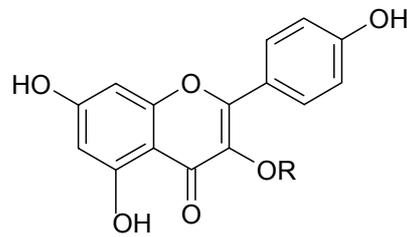
4-Metilacetofenona



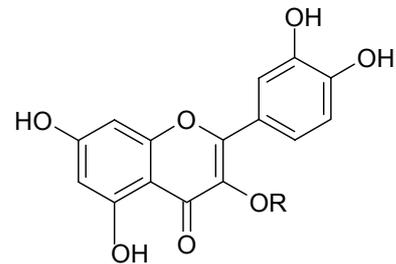
3,4,5-Trimetóxiacetofenona



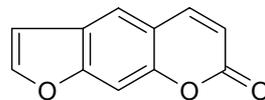
Ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico



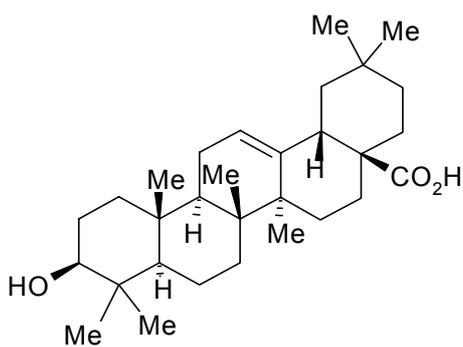
Campferol-3-o-rutinosídeo



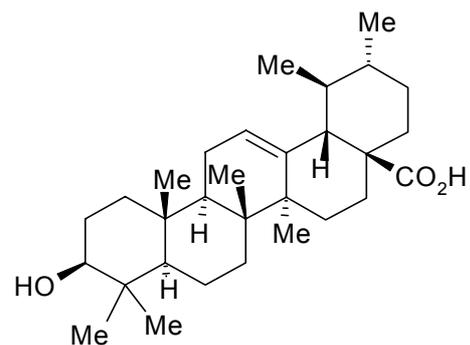
Rutina



Psoraleno

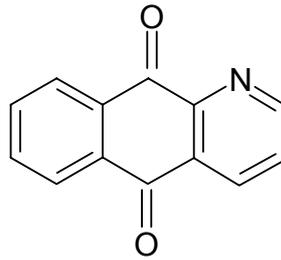


Ácido oleanólico



Ácido ursólico

As espécies de *Mitracarpus* são caracterizadas por serem ricas em alcalóides. Okunade et al. (1999) isolou um alcalóide com atividade antimicrobiana a partir do extrato etanólico das partes aéreas de *M. scaber*, o azaantraquinona (benzilisoquinolina-5,10-diona). Outros trabalhos (NOK, 2002; GBAGUIDI et al., 2005) confirmaram a potente atividade antimicrobiana deste alcalóide e também seu potencial como agente tripanomicida.



Azaantraquinona

Outra espécie de *Mitracarpus*, *M. villosus* (Sw) DC., foi estudada quanto às suas propriedades antimicrobianas. De acordo com Irob e Daramola (1993; 1994), o extrato etanólico de suas partes aéreas apresentou uma atividade significativa contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* entre outros. Jedege et al. (2005) investigaram farmacognosticamente as folhas desta espécie determinando perfis macro, micro e quimiomicromorfológicos; este trabalho estabeleceu padrões farmacognósticos de identificação, pureza, qualidade e classificação da planta o qual tem ganhado muita relevância na pesquisa de produtos naturais.

A espécie Mitracarpus frigidus (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum.

Mitracarpus frigidus (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum.(Figura VII) é encontrada principalmente na região que vai da América Tropical até as Antilhas. No Brasil, distribui-se desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul (PEREIRA, CARVALHO-OKANO e GARCIA, 2006).

Segundo estes autores, a espécie é caracterizada por serem ervas perenes, eretas, com 70 cm. Possui ramos tetragonais, pilosos nos ângulos; folhas subsésseis, verde-amareladas, lâmina elíptico-lanceolada, 3-8, 5 x 0,5-1,5 cm, hirsuta, nervuras primárias e secundárias proeminentes na superfície dorsal, ápice agudo, base atenuada; estípulas persistentes, 6-9 cerdas. Possui, ainda, inflorescências em glomérulos terminais e axiliares, multiflora; quatro brácteas, lanceoladas; flores sésseis, tetrâmera; cálice com quatro lobos triangulares, iguais dois a dois; corola tubulosa, branca, 2-2,5 cm, glabra, internamente com anel de tricomas na metade do tubo, lobos oval-triangulares 0,6-1,1 mm; estames exsertos;

filetes 0,3-0,5 mm; anteras subelipsóides; estilete exserto, 5 mm; estigma bifido. O fruto é caracterizado como cápsula, subglobosa, deiscência circuncisa, 1 x 0,6 mm, pericarpo coriáceo, com pilosidade translúcida na metade superior; sementes subelipsóides, castanhas, plano-convexas, superfície ventral com depressão em forma de Y de coloração esbranquiçada.

Após extensa pesquisa bibliográfica não foram encontrados relatos sobre suas propriedades química e/ou farmacológicas.



Figura VII – *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum. a) partes aéreas; b) fruto e semente. Fonte: PEREIRA, CARVALHO-OKANO e GARCIA, 2006.

Justificativa

Como resultado de um programa de triagem biológica, realizado no Laboratório de Pesquisa do Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, no qual foram testados 90 extratos referentes a 75 espécies vegetais de 23 famílias diferentes, em modelos biológicos *in vitro*, muitos deles mostraram-se suficientemente ativos para justificar seu fracionamento químico.

Assim, o extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* mostrou-se bastante ativo contra *Artemia salina*, alguns microrganismos e contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*, o que o torna bastante interessante do ponto de vista farmacológico. *M. frigidus* não foi investigada anteriormente do ponto de vista químico e/ou farmacológico, corroborando o estudo da espécie em questão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Conhecer o potencial químico-biológico de *Mitracarpus frigidus* (Willd ex Reem Schult.) K. Schum.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Biomonitorar o fracionamento do extrato metanólico de *M. frigidus* para a atividade antimicrobiana.
- 2- Avaliar as atividades citotóxica, leishmanicida e antioxidante de *M. frigidus*;
- 3- Extrair os alcalóides presentes de *M. frigidus* e avaliar sua atividade biológica;
- 4- Extrair, identificar e avaliar a atividade biológica do óleo de *M. frigidus*;
- 5- Identificar as classes de constituintes químicos presentes em *M. frigidus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas de *M. frigidus* foram coletadas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, em maio de 2004. Para extração de alcalóides e do óleo essencial, nova coleta foi realizada em maio de 2006. A exsicata foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ 46076) da Universidade Federal de Juiz de Fora (Figura 1).



Figura 1 – *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum.

3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO E DAS PARTIÇÕES DE *M. frigidus*

As partes aéreas de *M. frigidus* foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 40°C e pulverizadas, a fim de obter o material vegetal seco (1,0 kg). Este foi extraído por maceração com MeOH, à temperatura ambiente, até a exaustão. O extrato foi concentrado à pressão reduzida utilizando evaporador rotatório (Heidolph – Laborota 4000).

O extrato bruto (100 g), após remoção do solvente, foi ressuscitado em MeOH:água (8:2) e, em seguida, particionado com solventes de polaridades crescentes: hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e *n*-BuOH (5 X 200 ml) (Figura 2). Os solventes foram evaporados e as partições foram pesadas e mantidas sobre refrigeração até o momento da realização dos ensaios fitoquímicos e biológicos.

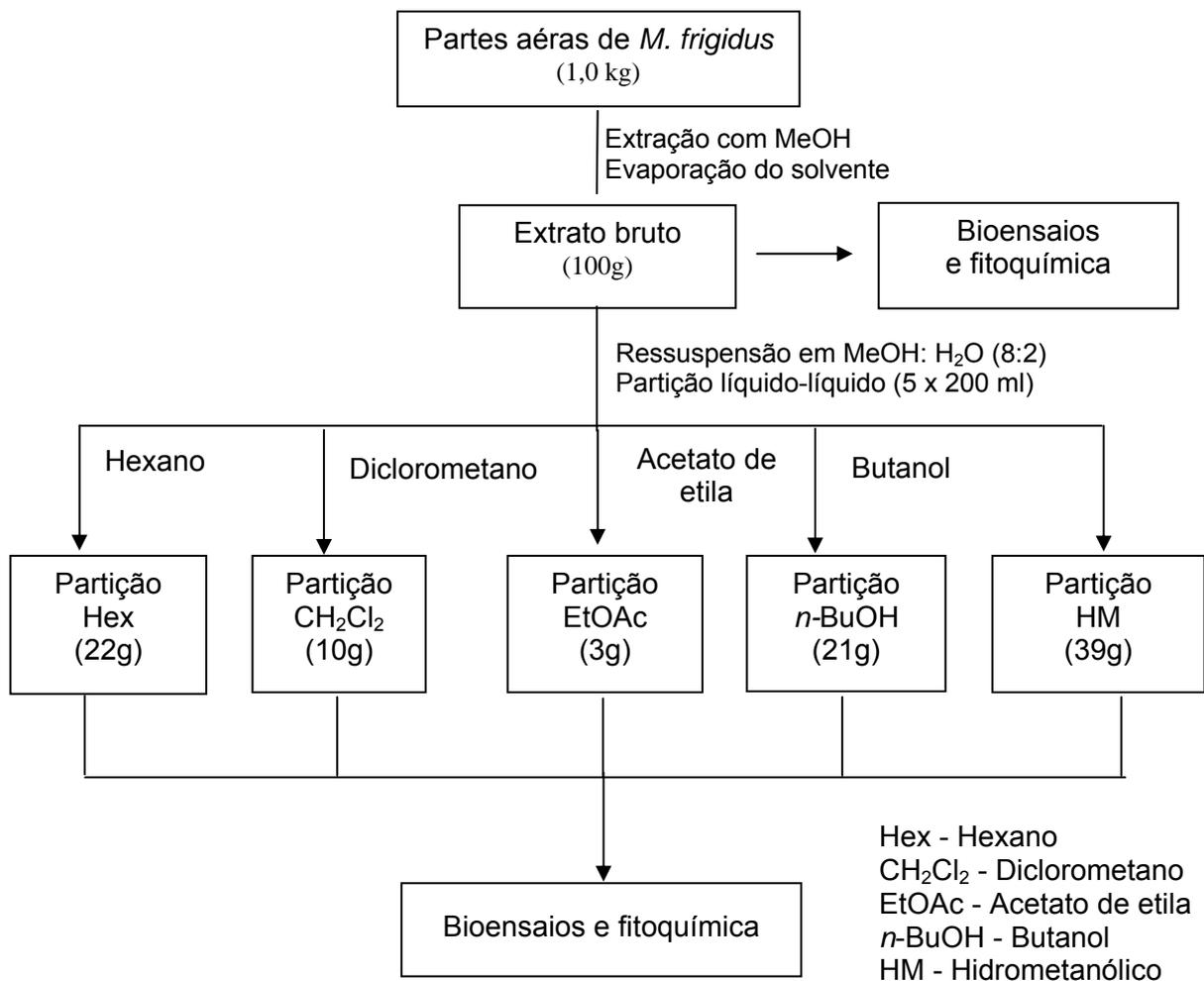


Figura 2 – Fluxograma da extração e partição líquido-líquido das partes aéreas de *M. frigidus*.

3.3 DETERMINAÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS POR CLAE DAS AMOSTRAS OBTIDAS DE *M. frigidus*

Para determinar os perfis cromatográficos das amostras foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), Agilent Technologies 1200 Series, com detector de arranjo de fotodiodos e injetor automático. Para separação das substâncias empregou-se coluna de fase reversa (Zorbax SB-18; 25 cm X 4,6 cm X 5 µm) e um gradiente linear dos solventes A (acetonitrila: água, 5:95, v/v, pH 4,0 com H₃PO₄) e B (acetonitrila: água, 90:10, v/v, pH 4,0 com H₃PO₄) variando de 0% - 100% B em 30 min; o fluxo foi 1 ml/min. Após 44 min, o programa de eluição retornou à condição inicial e nova injeção foi realizada depois de 10 min; o volume de injeção foi de 10µl, na concentração de 1 mg/ml e a temperatura mantida a 25° C durante a análise. A detecção foi feita nos comprimentos de onda de 210, 230, 254 e 280 nm.

3.4 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO METANÓLICO E DAS PARTIÇÕES DE *M. frigidus*

As amostras (extrato e partições) foram submetidas às análises fitoquímicas preliminares para determinação das principais classes químicas de metabólitos especiais, de acordo com o protocolo descrito por Matos (1997), com algumas modificações.

3.4.1- Preparo das amostras para análise dos metabólitos especiais

Aproximadamente 100 mg de cada amostra foram solubilizados em MeOH e utilizados para identificação de alcalóides, triterpenóides, esteróides, saponinas, cumarinas, compostos fenólicos, taninos, flavonóides, antraquinonas, antocianidinas, chalconas, leucoantocianidinas, catequinas e flavononas.

3.4.1.1- Alcalóides

Em uma placa de Elisa, 150 µl da amostra foram colocados em três poços diferentes e 50 µl de diferentes reagentes utilizados para identificação de alcalóides (Reativos de Hager, Mayer e Dragendorff) foram adicionados em cada poço. O aparecimento de precipitado ou turvação branca com os reativos de Hager e Mayer e de cor alaranjada com o reativo de Dragendorff indicou a presença de alcalóides.

3.4.1.2 – Triterpenóides e Esteróides

Em uma placa de Elisa, 150 µl da amostra foram colocados em um poço. Em seguida foram acrescentados 1 gota de anidrido acético e 1 a 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de cor azul-esverdeada foi indicativo da presença de esteróides e de cor vermelha, da presença de triterpenóides.

3.4.1.3- Saponinas

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 ml da amostra e aproximadamente 2 ml da água destilada. O tubo foi agitado vigorosamente por 30 min e colocado em repouso por 20 min. A presença de espuma persistente com aproximadamente 1 cm de altura indicou a presença de saponinas.

3.4.1.4- Cumarinas

A amostra foi gotejada em um pedaço de papel de filtro. Em seguida, 1 gota da solução de KOH 10% foi adicionada à amostra. O aparecimento de fluorescência de cor azulada sob luz UV 365 nm indicou a presença de cumarinas.

3.4.1.5- Compostos fenólicos

Em uma tira de papel de filtro a amostra foi gotejada seguida de uma solução de FeCl₃ 2%. O aparecimento de uma mancha azul escura indica a presença de compostos fenólicos.

3.4.1.6- *Taninos*

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 ml da amostra e gota a gota, foi acrescentada uma solução de gelatina 2,5%. O aparecimento de precipitado branco indicou a presença de taninos.

3.4.1.7- *Flavonóides*

Em uma tira de papel de filtro a amostra foi gotejada seguida da adição de uma solução de AlCl_3 5%. O aparecimento de fluorescência de cor amarela sob luz UV 365 nm indicou a presença de flavonóides.

3.4.1.8- *Antraquinonas*

Em uma placa de Elisa, 150 μl da amostra foram colocados em um poço. Em seguida foram adicionados 50 μl de NaOH 0,5M. O aparecimento de coloração vermelha indicou a presença de antraquinonas.

3.4.1.9- *Antocianidinas e Chalconas*

Em três tubos de ensaio foram adicionados 1 ml da amostra. O tubo 1 foi acidificado com HCl 0,5M (pH 3). O tubo 2 e 3 foram alcalinizados com NaOH 0,5M (pH 8 e 11, respectivamente). O aparecimento de coloração vermelha, lilás e azul-púrpura nos tubos 1, 2 e 3, respectivamente, indicou a presença de antocianidinas. Coloração vermelha nos tubos 1 e 3 foi indicativo de chalconas.

3.4.1.10- *Leucoantocianidinas e Catequinas:*

Em um tubo de ensaio 1 ml da amostra foi acidificado com HCl 0,5M (pH 3). Em seguida, o tubo foi aquecido, em bico de Bunsen, cuidadosamente. O aparecimento de coloração vermelha indicou a presença de leucoantocianidinas e amarela de catequinas.

3.4.1.11- Flavononas

Em um poço da placa de Elisa foram adicionados 150µl da amostra e alguns pedaços de magnésio metálico. Em seguida, acrescentou-se 1 gota de HCl concentrado. O aparecimento de coloração vermelha indicou presença de flavononas.

3.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS DO EXTRATO METANÓLICO E DAS PARTIÇÕES DE *M. frigidus*

O conteúdo de compostos fenólicos totais nas amostras foi determinado pelo método de Folin-Denis (DUH e YEN, 1997). Uma solução estoque em MeOH de cada amostra (0,5 mg/ml) foi preparada. Um ml desta solução foi misturado com 1 ml do reagente de Folin-Denis e 8 ml de Na₂CO₃ 2% em tampão NaOH 0,1N. A mistura foi agitada e após 60 min de incubação em banho-maria a 30°C, foi centrifugada a 3000 g/min. A absorbância do sobrenadante foi medida a 730 nm em espectrofotômetro (Espectrofotômetro BEL Photonics®). Esta determinação foi realizada em triplicata e a média dos resultados foi utilizada para o cálculo do teor de compostos fenólicos. Alíquotas de 0,07 a 0,5 ml de uma solução de ácido tânico (1 g/l) (Vetec) foram utilizadas para preparação da curva de calibração. O branco foi preparado com 1 ml de MeOH, 8 ml de tampão Na₂CO₃ em NaOH 0,1N e 1 ml do reagente de Folin-Denis. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. O conteúdo de compostos fenólicos foi expresso em mg/g amostra vegetal, em equivalentes de ácido tânico (EAT).

3.6 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FLAVONÓIDES DO EXTRATO METANÓLICO E DAS PARTIÇÕES DE *M. frigidus*

O conteúdo de flavonóides foi determinado pelo método descrito por Miliauskas, Venskutonis e Van-Beer (2004), com pequenas modificações. Meio mg da amostra foi ressuspenso em 1 ml de MeOH e misturados com 1 ml de uma solução de AlCl₃ em etanol (20 g/l). O volume foi completado com etanol para 25 ml. A absorvância foi medida a 415 nm após 40 min de incubação a 20°C. Esta determinação foi realizada em triplicata e a média dos resultados foi utilizada para o

cálculo do teor de flavonóides. Rutina (Vetec) foi utilizada como substância de referência. A curva de calibração foi preparada utilizando-se alíquotas de 0,1 a 2,0 ml de uma solução etanólica de rutina (0,5 mg/ml). O branco foi preparado com 1 ml da amostra vegetal e 1 gota de ácido acético e diluído para 25 ml. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. O conteúdo total de flavonóides foi expresso em mg/g de extrato vegetal, em equivalentes de rutina (ER).

3.7 FRACIONAMENTO DA PARTIÇÃO DICLOROMETÂNICA (CH₂Cl₂)

A partição CH₂Cl₂ (4,8g) foi fracionada usando coluna cromatográfica em sílica-gel (Merck, 70-230 mesh ASTM) de tamanho 74 X 4 cm, com gradiente crescente de eluição (clorofórmio, clorofórmio-acetato de etila, acetato de etila-MeOH e MeOH) (Figura 3). As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico em 20 frações.

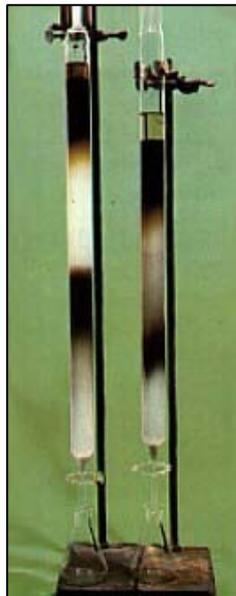


Figura 3 – Cromatografia em coluna da partição CH₂Cl₂ de *M. frigidus*.

Estas frações foram concentradas à pressão reduzida, utilizando evaporador rotatório, pesadas e mantidas sobre refrigeração até a realização dos testes biológicos.

As frações mais ativas foram submetidas à análise em CLAE, nas mesmas condições descritas no item 3.3 e tiveram suas classes de constituintes identificadas por meio de CCD em sílica gel 60 F254 (Merck) com fase móvel hexano:AcOEt, 60:40, v/v, para as frações de F₅ a F₁₀ e com fase móvel hexano:AcOEt, 30:70,v/v para as frações de F₁₁ a F₁₆. As placas foram visualizadas sob luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 e reveladas com os reativos ácido sulfúrico:vanilina, como revelador universal; KOH 10% (reativo de Borntrager), para identificação de antraquinonas e cumarinas; Reativo de Dragendorff, para alcalóides; NP/PEG, para flavonóides e Liebermann-Burchard, para identificação de esteróides e triterpenos.

3.8 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE ALCALÓIDES DE *M. frigidus*

A extração de alcalóides foi realizada segundo protocolo descrito por Matos (1997), com algumas modificações. As partes aéreas de *M. frigidus* foram secas, pesadas (430g) e extraídas com hexano. Em seguida, o resíduo botânico foi seco em capela de exaustão e extraída exaustivamente com MeOH por 7 dias à temperatura ambiente. O extrato metanólico foi concentrado à pressão reduzida utilizando evaporador rotatório (78 g) e solubilizado em solução de ácido tartárico 2% (400 ml, pH 3-4). Após extração com acetato de etila (4 x 200 ml), a fase aquosa foi tratada com Na₂CO₃ 10% (pH 8-10) e extraída novamente com acetato de etila (4 x 200 ml). Todas as etapas foram monitoradas pelo reativo de Dragendorff (Figura 4).

Da fase aquosa precipitou-se um material de aspecto escuro e pastoso, rico em alcalóides, que foi retirado e solubilizado em MeOH (ppt_{MeOH}) (1,3 g) e submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica de Sephadex LH-20 (Merck) (80 x 3 cm), usando como fase móvel MeOH. As frações obtidas foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico em dez frações. As frações foram concentradas à pressão reduzida, utilizando evaporador rotatório, pesadas e mantidas sob refrigeração até a realização dos testes biológicos.

No extrato hexânico (15 g), também se verificou a presença de alcalóides (reação de Dragendorff positiva). Dessa forma, esse extrato também foi submetido ao procedimento de extração de alcalóides (Figura 4). Ao alcalinizar o extrato hexânico, um precipitado branco (ppt_{hex} , 50 mg) foi formado e, em seguida, separado do sobrenadante. Esse precipitado foi submetido à CCD (fase móvel: MeOH:ácido acético (8:2); revelação: reativo de Dragendorff).

Os perfis cromatográficos das frações F_{2A} , ppt_{MeOH} e ppt_{hex} foram analisados por CLAE, nas mesmas condições descritas no item 3.3.

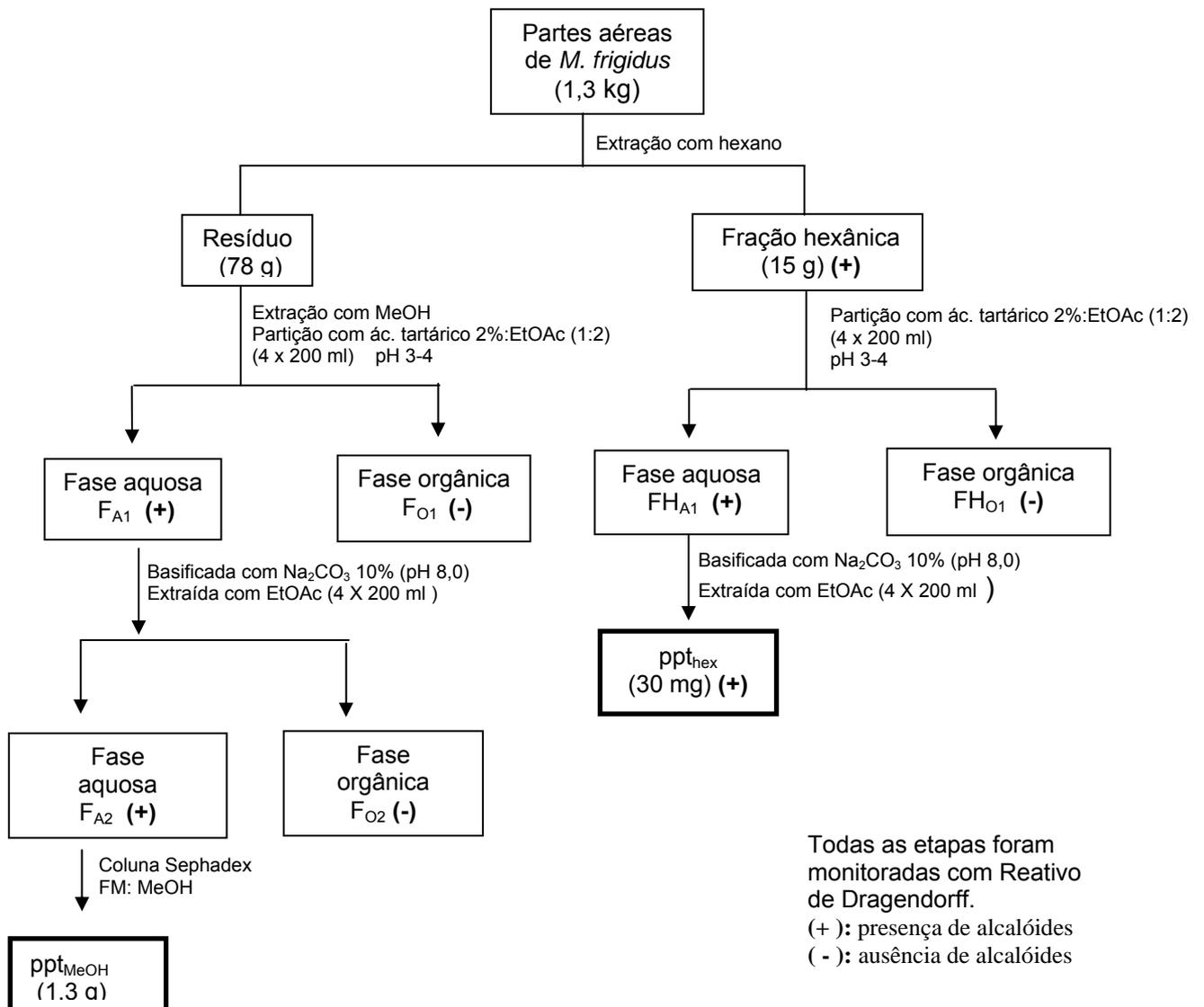


Figura 4- Fluxograma da extração de alcalóides de *M. frigidus*.

3.9 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *M. frigidus*

O óleo essencial das partes aéreas de *M. frigidus* foi obtido por hidrodestilação de acordo com Wasiky e Akisue (1969). O material vegetal seco e triturado (300g, dividido em três partes) foi colocado no balão de destilação contendo água destilada ocupando até aproximadamente 3/4 do volume do balão. O balão foi acoplado ao aparelho Clevenger e a hidrodestilação foi mantida, após aquecimento da água, por 3h. O óleo foi extraído com diclorometano, separado e seu rendimento foi calculado (% p/p). O óleo foi estocado a 4°C até ser analisado.

3.10 MICROEXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA (SPME)

Cinquenta µl de uma solução do óleo a 20 mg/ml foram transferidos para um frasco de vidro de 2 ml e o solvente removido sob vácuo (speedVac[®], SC250 modelo, ThermoSavant, U.S.A) por 18 horas, 30°C e 10 milibar. O frasco foi lacrado com septo de Teflon (Supelco, U.S.A) e colocado em bloco aquecido ajustado para 90°C. A fibra SPME (PDMS/DVB[™] 65 µm, SUPELCO, U.S.A) conectada a um aplicador manual, foi colocada em contato com a amostra (modo “headspace”) por 30 min. A seguir, a fibra foi inserida diretamente no injetor de um CG. Antes do uso, a fibra foi pré condicionada a 230° C durante 30 min no injetor do CG.

3.11 ANÁLISE DO ÓLEO POR CG/EM

As análises foram realizadas em um Cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu QP-5050A (SHIMADZU, JP) equipado com coluna PTE[™]-5 (30m, 0.25 mm, 0.25µm, Supelco, USA), usando hélio como gás carreador. As seguintes condições foram empregadas para todas as análises: hélio a 22,3 ml/min; temperatura do injetor mantida a 230°C; e do forno a 80°C durante 3 min e então aquecido até 300°C (7°C./min) permanecendo por 5 min a 300°C. A válvula “split” foi fechada durante o primeiro minuto de injeção e então aberta numa proporção de 1:10. O detector de massas foi programado para varredura de 50 a 500 unidades de massa atômica. A

aquisição e processamento dos dados foram realizados pelo software CLASS 5000 Shimadzu.

3.12 ANÁLISE DOS DADOS BRUTOS PELO “SOFTWARE” AMDIS (SISTEMA AUTOMATIZADO DE IDENTIFICAÇÃO E DECONVOLUÇÃO DE ESPECTROS DE MASSAS).

Os dados brutos foram analisados pelo “software” AMDIS, versão 2.1, cedido pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, USA). Uma mistura de *n*-alcanos contendo hidrocarbonetos de C9 a C30 foi usada para o cálculo dos índices de retenção (IR).

3.13 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.13.1- Atividade antioxidante (DPPH)

O método de Brand-Williams (GOVINDARAJAN et al., 2003) tem por base a redução do radical 2,2'-difetil-1-picrihidrazilo (DPPH[•]), o qual apresenta um máximo de absorção a 517-520 nm. Ao fixar um H[•], abstraído do antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição da absorvância, o que permite calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH[•].

Resumidamente, as amostras foram solubilizadas em MeOH (1,0 mg/ml) e as soluções diluídas em solução metanólica do radical DPPH[•] (50 µmol/l) (Sigma) nas concentrações de 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91 e 1,95 µg/ml. Após um período de 30 minutos, foi feita a leitura da absorvância das amostras e do branco (MeOH + DPPH) num espectrofotômetro a 515 nm. A partir desses valores foram calculadas as % de inibição de oxidação das amostras.

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{Abs}_{\text{branco}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{branco}}} \times 100$$

O CI₅₀, que é a concentração da amostra necessária para reduzir a 50% à concentração inicial do DPPH, foi calculado a partir de regressão linear do MS Excel

Software (CHEVOLLEAU et al., 1992). Desta forma, quanto menor o valor de CI_{50} , maior a atividade antioxidante do composto. Ácido ascórbico, rutina e α -tocoferol (Sigma) foram utilizados como controle positivo.

O coeficiente de correlação (r^2) entre o teor de compostos fenólicos, referentes às concentrações utilizadas para o cálculo do CI_{50} , e a atividade antioxidante (porcentagem de inibição do radical DPPH) foi determinado usando MS Excel Software (função estatística CORREL).

3.13.2- Determinação do poder de redução

O poder de redução das amostras foi determinado pelo método descrito por Oyaiku (1986). Dez miligramas de cada amostra em 1 ml de água destilada foram misturados com 2,5 ml de tampão fosfato de potássio 200 μ M, pH 6,6 e 2,5 ml de ferrocianeto de potássio a 1% [$K_3Fe(CN)_6$]. A mistura foi incubada a 50 °C por 20 minutos. Uma alíquota de 2,5 ml de ácido tricloroacético 10% foi adicionada à mistura, que foi então centrifugada a 3000 g por min. A camada superior foi retirada e misturada com 2,5 ml de água destilada e 0,5 ml de $FeCl_3$ 0,1% e a absorbância foi medida a 700 nm em espectrofotômetro. Ácido ascórbico (Vetec) foi usado como referência. CE_{50} foi calculado a partir de três concentrações (54,00; 27,00 e 13,50 μ g/ml) e este valor determina a concentração efetiva na qual a absorbância foi 0,5 para o poder de redução. O CE_{50} foi determinado a partir de regressão linear do MS Excel Software.

O coeficiente de correlação (r^2) entre o teor de compostos fenólicos, referentes às concentrações utilizadas para o cálculo do CE_{50} , e o poder de redução (absorbância a 700 nm) foi determinado usando MS Excel Software (função estatística CORREL).

3.13.3- Atividade antimicrobiana

3.13.3.1- Atividade antifúngica pelo método de difusão em ágar

As cepas padrão de fungo usadas foram *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32608) e *Candida albicans* (ATCC 18804). A avaliação da atividade antifúngica foi

realizada de acordo com procedimentos descritos pelo Comitê Nacional para Padrões Clínicos Laboratoriais - NCCLS (2003). O meio de cultura ágar Sabouraud Dextrose (Acumedia), acrescido de 5% de glicose (Vetec) para o crescimento de *C. neoformans* e *C. albicans* foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e colocado em placas de Petri. Inicialmente, foi feito um inóculo, tocando-se as cepas padrão do fungo com uma alça de platina. O repique foi realizado em placa de Petri que foi colocada em estufa biológica por 48h para crescimento do fungo. O inóculo foi adicionado à salina estéril para a padronização de uma densidade microbiana correspondente a 0,5 a 1,0 da escala de McFarland (10^8 células/ml). Em seguida foram aplicados 500 µl do inóculo em placa de Petri contendo ágar Sabouraud com o auxílio de um bastão em L de vidro. Após 15 min, foram feitos poços de 6 mm de diâmetro no ágar com o auxílio de um perfurador apropriado.

As amostras foram diluídas em DMSO para uma concentração final de 100 mg/ml. Em seguida, uma alíquota de 50 µl de cada amostra foi colocada, assepticamente, nos poços da placa de cultura, previamente semeada com o fungo. As placas foram incubadas por 72h a 35°C para *C. neoformans* e 48h a 37°C para *C. albicans*. Anfotericina B (0.2 mg/ml) (Sigma) foi dissolvida em DMSO e serviu como controle positivo. O diâmetro da zona de inibição foi medido com régua apropriada e o resultado expresso em mm. Os testes foram realizados em duplicata.

3.13.3.2- Atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar

As cepas padrão de bactérias usadas neste trabalho foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Salmonella enterica* sorovar *tythimurium* (ATCC 13311), *Shigella sonnei* (ATCC 11060), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13866), *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Micrococcus luteus* (ATCC 10054), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Enterobacter cloacae* (ATCC 10699) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 10096).

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada de acordo com procedimentos descritos na literatura (PEREZ, PAULI e BAZERQUE, 1990; AHMAD, MEHMOOD e MOHAMMAD, 1998). O meio de cultura foi o ágar Mueller-Hinton (Biobrás Diagnósticos), preparado de acordo com as instruções do fabricante e colocados em placas de Petri. Inicialmente foi feito um inóculo tocando-se as colônias da cepa padrão com uma alça de platina fazendo o repique em placa de

Petri deixando em estufa biológica por 24h para crescimento. O inóculo foi adicionado à salina estéril para a padronização de uma densidade microbiana de 0,5 a 1,0 da escala de McFarland (10^8 células/ml). Em seguida 100µl do inóculo foi aplicado em ágar Mueller-Hinton com o auxílio de um bastão em L de vidro. Após 15 min, foram feitos poços de 6 mm de diâmetro no ágar com o auxílio de um perfurador apropriado.

As amostras vegetais foram diluídas em DMSO para uma concentração final de 100mg/ml e uma alíquota de 50 µl de cada extrato foi colocado, assepticamente, nos poços da placa de cultura, previamente semeada com a bactéria. As placas foram incubadas a 37°C, e observadas após 24h. O diâmetro da zona de inibição foi expresso em mm. Todos os testes foram realizados em duplicata. Cloranfenicol (disco de 30µg) (Sigma) foi usado como controle positivo.

3.13.3.3- Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O ensaio de susceptibilidade em microdiluição em caldo foi realizado usando o método descrito pela NCCLS para determinação do CIM (NCCLS, 2002). Todos os testes foram realizados utilizando caldo Mueller-Hinton (MHB) (Isofar) para bactérias e RPMI-1640 (Sigma) para fungos. Cepas de bactérias foram cultivadas “overnight” a 37°C por 24h em ágar Mueller Hinton e as cepas de fungos a 35°C por 48h em ágar Sabouraud Dextrose. Diluições sucessivas de 5,0 a 0,0025 mg/ml das amostras foram preparadas em microplacas de 96 poços. Para isso foram utilizadas soluções estoque de 25 mg/ml em DMSO 1%. Foram transferidos 80µl dessa solução para as microplacas, que já continham 100µl de meio de cultura. Para completar o volume final de 20µl, foram adicionados 20µl de inóculo (10^8 unidades formadoras de colônias (CFU/ml), de acordo com a escala turbidimétrica padrão de McFarland). As placas foram incubadas a 37°C por 24h para bactérias e 35°C por 48h para fungos. Os mesmos testes foram realizados simultaneamente com o crescimento do controle (MHB ou RPMI-1640 + microorganismo) e o controle negativo (MHB ou RPMI-1640 + extrato). Cloranfenicol (Feniclor[®]) e a Anfotericina B foram usados como compostos de referência com concentrações de 500 a 0,24 µg/ml e de 10 a 0.002 µg/ml, respectivamente. O CIM foi calculado como a menor diluição que apresenta completa inibição da cepa testada. Todos os testes foram realizados em duplicatas.

3.13.3.4- Avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana

O valor da atividade total descrito por Eloff (2004) foi aplicado, bem como o valor do percentual de atividade que demonstra o potencial antimicrobiano dos extratos e índice de susceptibilidade microbiana (ISM), que é usado para comparar a susceptibilidade relativa entre as cepas microbianas (BONJAR, 2004):

Atividade Total:

$$\text{Atividade total} = \frac{\text{Quantidade de material extraído (em mg) por 1g de planta}}{\text{CIM}}$$

Este valor indica quantas vezes os compostos biologicamente ativos, presentes em 1g de planta, podem ser diluídos e ainda inibir o crescimento de microrganismos (ELOFF, 2004).

Percentual de Atividade (%):

$$\text{Atividade (\%)} = \frac{100 \times \text{n}^\circ \text{ de cepas susceptíveis à amostra}}{\text{Total de cepas microbianas testadas}}$$

O percentual de atividade demonstra o potencial total antimicrobiano dos extrato. Este número apresenta a quantidade de cepas susceptíveis a um determinado extrato.

Índice de Susceptibilidade Microbiana (ISM):

$$\text{ISM} = \frac{100 \times \text{n}^\circ \text{ de extratos efetivos contra cada cepa microbiana}}{\text{Total de amostras}}$$

ISM é usado para comparar a susceptibilidade relativa entre cepas microbianas. O valor de ISM varia de '0' (resistente a todas amostras) até '100' (susceptíveis a todas amostras).

3.13.3.5- Bioautografia

O método da bioautografia realizado neste estudo seguiu o protocolo descrito por Collins, Braga e Bonato (1997). Dez µl das amostras na concentração de 10 mg/ml foram aplicados em cromatoplasmas de sílica gel 60 F 254 (Merck) (10 x 8 cm) e eluídas com hexano:AcOEt (40:60).

As leveduras *C. albicans* e *C. neoformans* foram subcultivadas em ágar Sabouraud Dextrose. Para o inóculo foram preparadas 15 ml das suspensões de células em caldo Sabouraud Dextrose (Difco) contendo 10^4 - 10^5 células/ml (utilizando-se como base a escala de MacFarland). As cromatoplasmas, após total evaporação da fase móvel, foram mergulhadas em 15 ml de suspensão das leveduras e, posteriormente, colocadas em placas de Petri para incubação. Os experimentos foram realizados em duplicata. As placas contendo *C. albicans* foram incubadas à temperatura de 35°C, por 48h, aquelas com *C. neoformans*, à temperatura de 35°C, por 72h.

Para revelação das cromatoplasmas utilizou-se solução de *p*-iodonitrotetrazolium (INT) (Sigma), na concentração de 2 mg/ml. Essa solução foi borrifada sobre as placas e, após incubação de 4h, as zonas de inibição foram observadas.

Cromatoplasmas de referência foram desenvolvidas em sílica gel 60 F 254, fase móvel hexano:AcOEt, 60:40, v/v, a fim de se identificar qual (is) a(s) classe(s) de fitoconstituintes bioativos estavam presentes nas amostras. Foram utilizados os seguintes reveladores: ácido sulfúrico:vanilina, como revelador universal; KOH 10% (reativo de Borntrager), para identificação de antraquinonas e cumarinas; Dragendorff, para alcalóides; NP/PEG, para flavonóides e Liebermann-Burchard, para identificação de esteróides e triterpenos. O fator de retenção (Rf) foi calculado para cada banda que apresentou zona de inibição do crescimento das leveduras.

3.13.4 - Atividade leishmanicida

Promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/Br/75/Josefa isoladas de um paciente com leishmaniose cutânea difusa) e *L. chagasi* (MHOM/Br/74/PP75 isoladas de um paciente com leishmaniose visceral) foi usado para o ensaio *in vitro*. A atividade leishmanicida foi realizada de acordo com o método descrito por M'Bongo et al. (1997). No ensaio da atividade antipromastigota, as formas promastigotas são contadas na câmara de Neubauer. Os parasitas foram lançados à razão de 2×10^6 células/ml de meio Warren (Sigma) com 10% de soro bovino fetal (Sigma) para *L. amazonensis* e 3×10^6 células/ml de meio 199 (Sigma) com 10% de soro bovino fetal (Sigma) para *L. chagasi*, em uma placa de 96 poços. As drogas a serem testadas foram adicionadas após 1h em concentrações variadas. Os testes foram feitos em triplicatas. Em três poços não houve adição de drogas, estes são o controle. Após três dias de incubação em estufa à 24°C, foi adicionado 10µl de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico (MTT; Sigma) (MOSSMAN, 1983) a 5 mg/ml em cada poço e incubado durante 4h. A reação foi interrompida pela adição de 100 µl de isopropanol / ácido clorídrico (100 ml de isopropanol / 0,4 ml de HCl 10 N) e lida em um espectrofotômetro à 570 nm. Os resultados são mostrados em porcentagem de inibição em relação ao padrão (controle). A partir do teste de viabilidade, é determinada a concentração inibitória (CI₅₀) de cada droga, que representa a concentração molecular que inibe 50% do crescimento celular. Anfotericina B foi usada como droga de referência. O CI₅₀ foi calculado pelo programa estatístico Grafit 5.

3.13.5- Atividade citotóxica contra *Artemia salina* (“Brine Shrimp Test”)

A presença de constituintes citotóxicos foi avaliada utilizando-se a metodologia proposta por Meyer et al. (1982) e modificada por Afonso-Neto (2003). Larvas de *Artemia salina* (náuplios), obtidas a partir de ovos utilizados como ração para peixes ornamentais (TROPFISH®), foram colocadas para eclodir em aquário com água do mar artificial arejada durante 48h. As amostras foram solubilizadas em água do mar artificial, com a ajuda de um diluente (DMSO 1%). Os testes foram realizados em tubos de ensaio com 10 náuplios, preenchidos com 4,5 ml de água do mar artificial e 0,5 ml do material a ser avaliado. As amostras foram testadas nas

concentrações de 1000, 100 e 10 $\mu\text{g/ml}$. Após 24 horas foram contados os indivíduos vivos nas diferentes concentrações. Timol (Vetec) e a água do mar artificial + DMSO 1% foram usados com controles positivo e negativo, respectivamente. Os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em CL_{50} (concentração necessária para matar 50% dos náuplios) que foi calculado pelo programa estatístico Probit (FINNEY, 1971).

4 RESULTADOS

4.1 EXTRATO BRUTO E PARTIÇÕES DE *M. frigidus*

Análise fitoquímica

Os resultados da triagem fitoquímica do extrato bruto e das partições de *M. frigidus* estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Triagem fitoquímica do extrato bruto e das partições de *M. frigidus*.

Amostras	Classes de constituintes químicos ^a													
	Al	Tr	E	S	C	Fe	T	F	An	Ant	Ch	L	Ca	Fl
Extrato bruto	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Hexano	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
CH ₂ Cl ₂	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
AcOEt	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>n</i> -BuOH	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Hidrometanólico	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+

^a Classes de constituintes químicos: Al, Alcalóides; Tr, Triterpenóides; E, Esteróides; S, Saponinas; C, Cumarinas; Fe, Fenóis; Ta, Taninos; F, Flavonóides; An, Antraquinonas; Ant, Antocianidinas; Ch, Chalconas, L, Leucoantocianidinas; Ca, Catequinas; Fl, Flavononas.

Teores de fenóis totais e flavonóides

Os teores de compostos fenólicos totais e de flavonóides do extrato bruto e das partições de *M. frigidus* estão representados na Tabela 2. Uma correlação positiva foi observada entre os conteúdos de compostos fenólicos e de flavonóides.

Tabela 2 – Teores de compostos fenólicos e flavonóides do extrato bruto e das partições de *M. frigidus*.

Amostras	Fenóis totais como equivalentes a ácido tânico (mg/g de extrato bruto/partição) ^a	Flavonóides como equivalentes a rutina (mg/g de extrato bruto/partição) ^a
Extrato Bruto	132 ± 0,05	76 ± 0,02
Hexano	48 ± 0,04	15 ± 0,003
CH ₂ Cl ₂	245 ± 0,06	69 ± 0,03
AcOEt	515 ± 0,06	240 ± 0,02
<i>n</i> -BuOH	423 ± 0,05	145 ± 0,02
Hidrometanólico	313 ± 0,05	109 ± 0,02

^a Médias de ensaios em triplicata ± desvio padrão.

Atividade antioxidante e poder de redução

O potencial antioxidante frente ao radical DPPH[•] e a habilidade redutora de íons ferro do extrato bruto e das partições de *M. frigidus* estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Atividade antioxidante e o poder de redução do extrato bruto e das partições de *M. frigidus*.

Amostras	Ensaio DPPH ^c CI ₅₀ (µg/ml) ^a	Poder de redução CE ₅₀ (µg/ml) ^b
Extrato Bruto	30,0 ± 3,2	48,0 ± 0,1
Hexano	44,0 ± 0,2	131,0 ± 0,02
CH ₂ Cl ₂	14,0 ± 2,8	48,0 ± 0,06
AcOEt	7,0 ± 2,3	35,0 ± 0,14
<i>n</i> -BuOH	9,0 ± 5,3	40,5 ± 0,11
Hidrometanólico	12,0 ± 1,7	44,0 ± 0,1
Rutina ^c	13,0 ± 1,8	
Ácido ascórbico ^c	4,0 ± 1,7	25,0 ± 0,23
α-tocoferol ^c	0,2 ± 0,2	

^a 95% intervalo de confiança em parênteses.

^b Média ± erro padrão.

^c Controles positivos.

A Figura 5 apresenta os valores da porcentagem de inibição da oxidação do radical DPPH pelo extrato bruto e pelas partições de *M. frigidus* relativos à atividade antioxidante e a Figura 6 apresenta os valores da absorvância a 700 nm relativos ao poder de redução das amostras.

Os gráficos apresentados na Figura 7 mostram a correlação entre a atividade antioxidante (% de inibição da oxidação do radical DPPH) e o teor de compostos fenólicos das amostras nas concentrações utilizadas para o cálculo do CI₅₀. Os gráficos apresentados na Figura 8 mostram a correlação entre a capacidade redutora (absortividade a 700 nm) e o teor de compostos fenólicos das amostras nas concentrações utilizadas para calcular o CE₅₀.

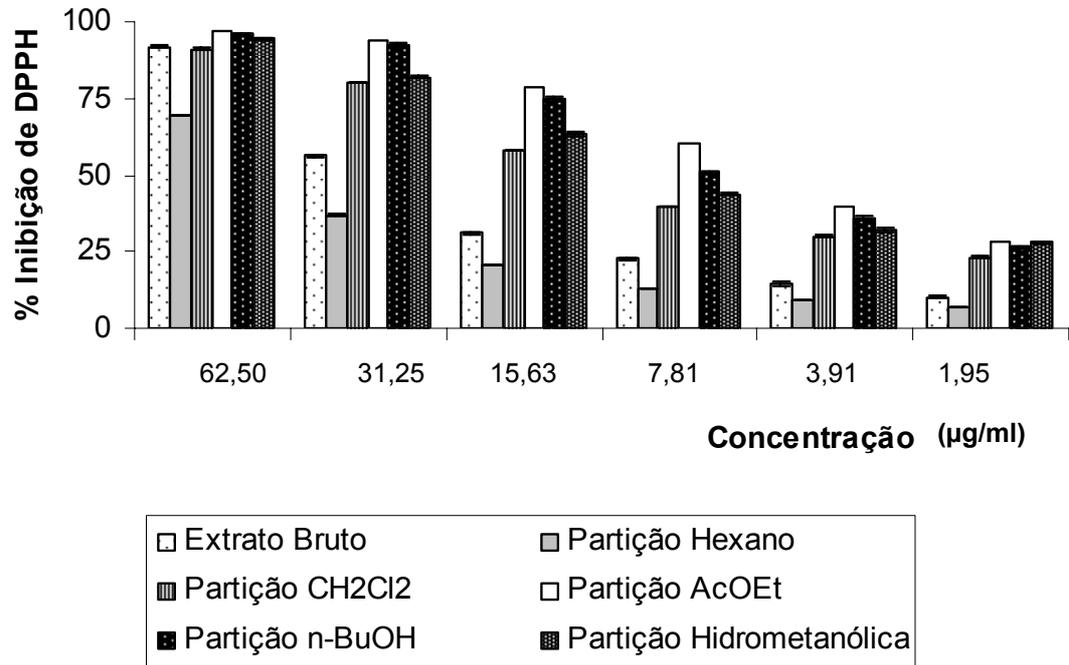


Figura 5 - Atividade antioxidante do extrato bruto e das partições de *M. frigidus* em diferentes concentrações pelo método do DPPH. Os valores correspondem à média de três repetições \pm desvio padrão ($P < 0,05$).

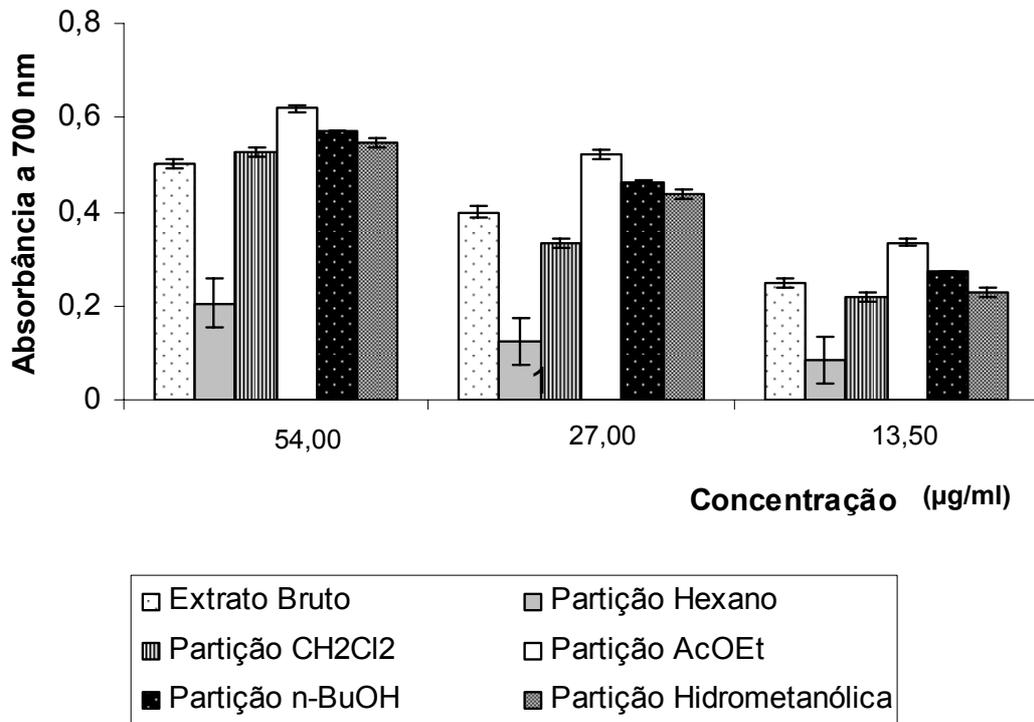


Figura 6 - Poder de redução do extrato bruto e das partições de *M. frigidus* em diferentes concentrações. Os valores correspondem à média de três repetições \pm desvio padrão ($P < 0,05$).

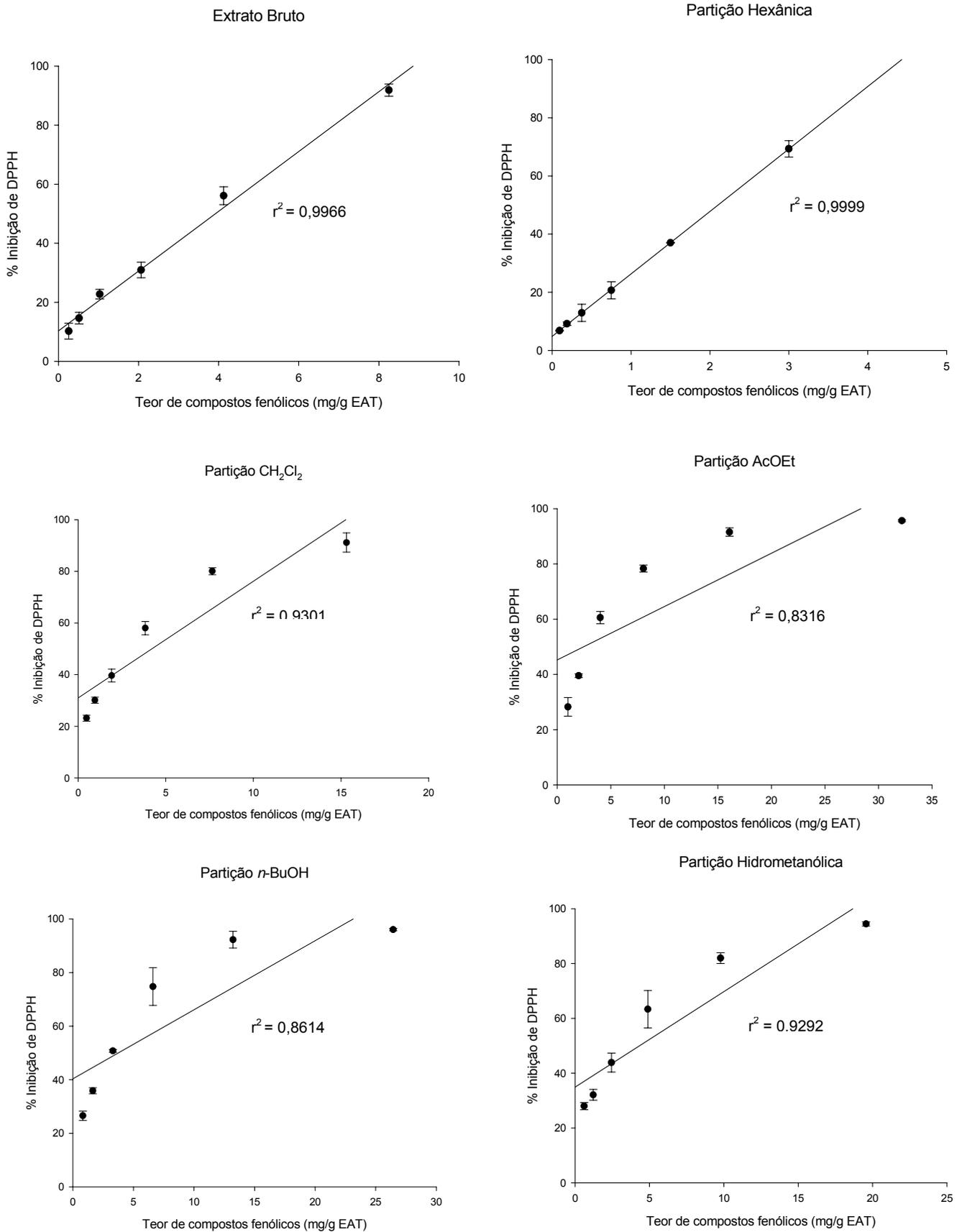
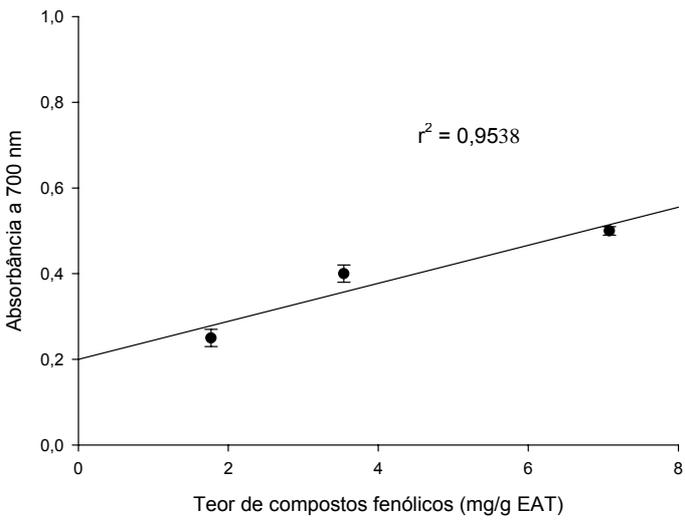
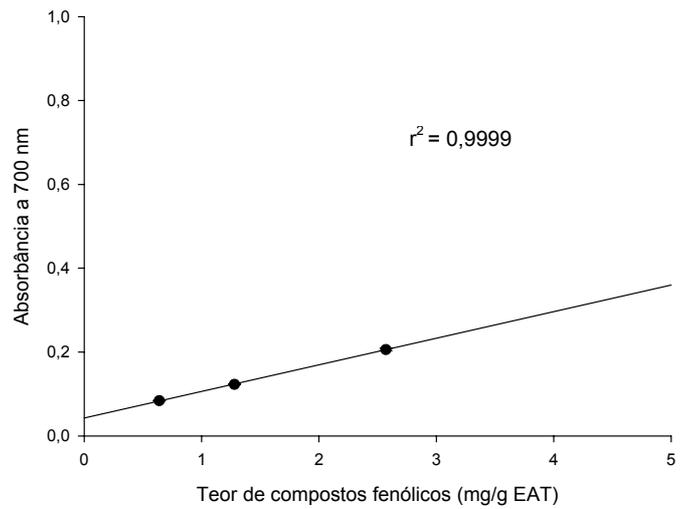
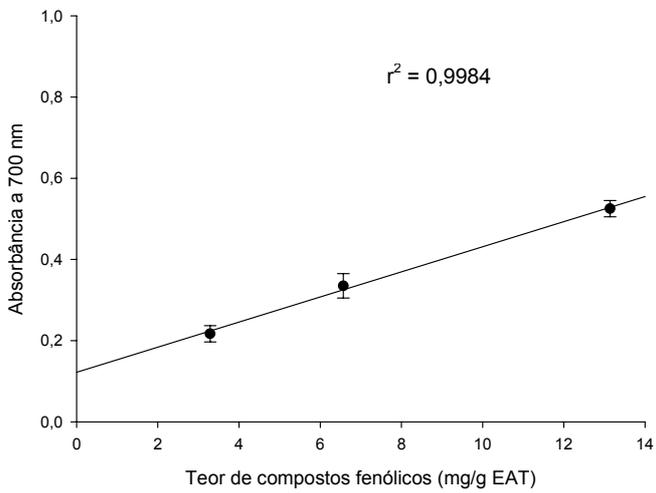


Figura 7 – Correlação entre a atividade antioxidante (ensaio com DPPH) do extrato bruto e das partições de *M. frigidus* e o conteúdo de compostos fenólicos. Os valores correspondem à média de três repetições \pm desvio padrão.

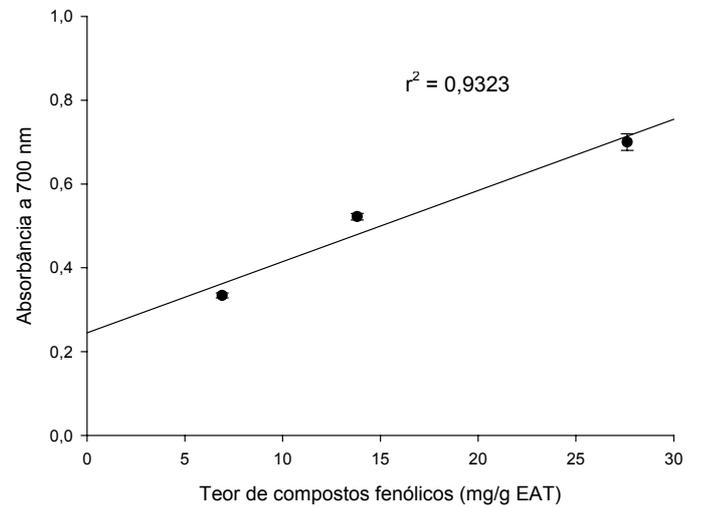
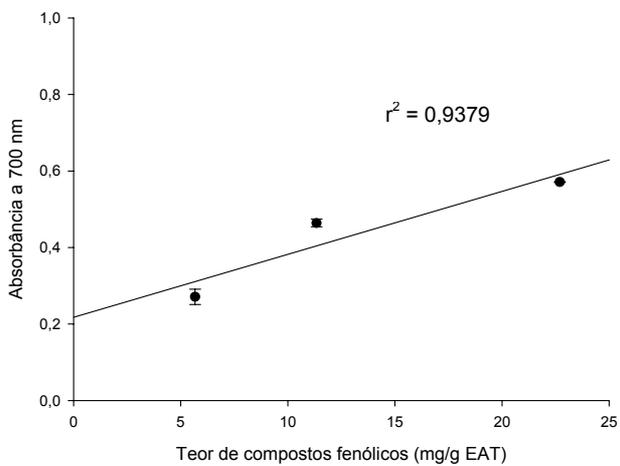
Extrato Bruto



Partição Hexânica

Partição CH₂Cl₂

Partição AcOEt

Partição *n*-BuOH

Partição Hidrometanólica

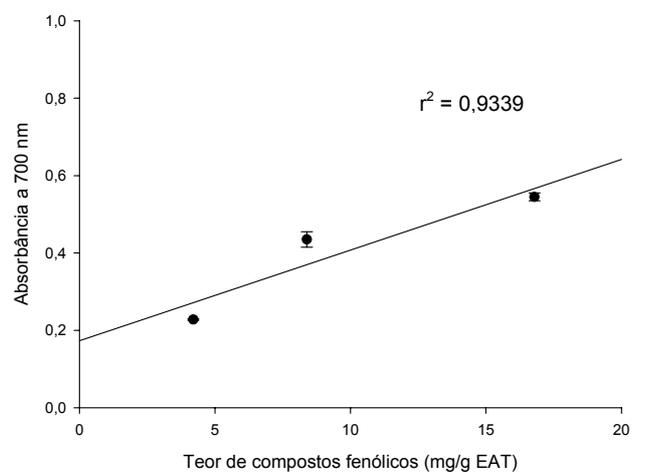


Figura 8 – Poder de redução do extrato bruto e das partições de *M. frigidus*. Os dados são apresentados como a média de três repetições \pm desvio padrão.

Atividade antimicrobiana

O método de diluição em ágar foi realizado com o objetivo de se avaliar qualitativamente a atividade antimicrobiana das amostras. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Atividade antimicrobiana pelo método de diluição em ágar (halo de inibição) do extrato bruto e das partições de *M. frigidus*.

Amostras	Atividade antibacteriana (halo em mm) ^{a,b}											Atividade antifúngica (halo em mm) ^{a,b}	
	Sa	Ec	St	Ss	Kp	Bc	Pa	Ml	Ef	En	Sp	Ca	Cn
Extrato Bruto	23	11	13	17	10	24	11	15	12	10	12	22	13
Hexano	0	0	0	20	11	19	8	10	10	9	16	20	13
CH ₂ Cl ₂	12	13	14	23	13	23	13	14	16	13	15	30	15
AcOEt	0	10	9	13	10	17	11	0	11	10	0	20	18
<i>n</i> -BuOH	0	0	8	10	8	11	10	9	0	10	0	0	10
Hidrometanólico	0	7	0	9	10	12	12	0	0	10	0	30	18
Cloranfenicol ^c	20	18	30	32	30	30	28	25	29	30	22		
Anfotericina B ^c												20	20

^a Microrganismos testados: Sa, *Staphylococcus aureus*; Ec, *Escherichia coli*; St, *Salmonella enterica* sorovar *tythimurium*; Ss, *Shigella sonnei*; Kp, *Klebsiella pneumoniae*; Bc, *Bacillus cereus*; Pa, *Pseudomonas aeruginosa*; Ml, *Micrococcus luteus*; Ef, *Enterococcus faecalis*; En, *Enterobacter cloacae*; Sp, *Streptococcus pyogenes*; Ca, *Candida albicans*; Cn, *Cryptococcus neoformans*.

^b Média da duplicata dos diâmetros dos halos de inibição em mm.

^c Controles positivos.

Com base nestes resultados foi realizado o método de microdiluição seriada a fim de se determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das amostras ativas. Os valores obtidos variaram de 5,0 a 0,010 mg/ml (Tabela 5).

Utilizando os valores da CIM e o rendimento do extrato bruto e das partições em relação à planta seca foi calculada a atividade total das amostras (Tabela 5).

Tabela 5– Concentração inibitória mínima (CIM) e atividade total do extrato bruto e das partições de *M. frigidus*.

Amostras	Microrganismos	CIM (mg/ml)	Atividade Total (ml/g)
Extrato Bruto	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,5	40
	<i>Escherichia coli</i>	1,25	80
	<i>Salmonella typhimurium</i>	0,625	160
	<i>Shigella sonnei</i>	0,313	320
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,625	160
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,25	80
	<i>Bacillus cereus</i>	0,078	1282
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1,25	80
	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,5	40
	<i>Micrococcus luteus</i>	2,5	40
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,25	80
	<i>Candida albicans</i>	1,25	80
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,313	320
	Hexano	<i>Shigella sonnei</i>	0,156
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		2,5	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		2,5	18
<i>Bacillus cereus</i>		0,156	141
<i>Enterococcus faecalis</i>		0,313	70
<i>Enterobacter cloacae</i>		0,625	35
<i>Micrococcus luteus</i>		2,5	18
<i>Streptococcus pyogenes</i>		0,078	282
<i>Candida albicans</i>		2,5	18
<i>Cryptococcus neoformans</i>		0,313	70
CH ₂ Cl ₂	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,313	32
	<i>Escherichia coli</i>	0,313	32
	<i>Salmonella typhimurium</i>	0,313	32
	<i>Shigella sonnei</i>	0,039	256
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,156	64
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,25	8

	<i>Bacillus cereus</i>	0,020	500
	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,039	256
	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,039	256
	<i>Micrococcus luteus</i>	0,625	16
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,25	8
	<i>Candida albicans</i>	0,313	32
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,010	1000
AcOEt	<i>Escherichia coli</i>	0,625	5
	<i>Salmonella typhimurium</i>	1,25	3
	<i>Shigella sonnei</i>	0,313	10
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,5	2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,5	2
	<i>Bacillus cereus</i>	0,313	10
	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,625	5
	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,5	2
	<i>Candida albicans</i>	1,25	3
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,078	38
n-BuOH	<i>Salmonella typhimurium</i>	2,5	42
	<i>Shigella sonnei</i>	2,5	42
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,0	21
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,0	21
	<i>Bacillus cereus</i>	1,25	84
	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,625	168
	<i>Micrococcus luteus</i>	2,5	42
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,25	84
Hidrometanólico	<i>Escherichia coli</i>	5,0	78
	<i>Shigella sonnei</i>	1,25	312
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,0	78
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,5	156
	<i>Bacillus cereus</i>	1,25	312
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,25	312
	<i>Candida albicans</i>	5,0	78
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,25	312

Cloranfenicol ^a	<i>Staphylococcus aureus</i>	62,5
	<i>Escherichia coli</i>	15,6
	<i>Salmonella typhimurium</i>	0,98
	<i>Shigella sonnei</i>	0,98
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,98
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15,6
	<i>Bacillus cereus</i>	3,9
	<i>Enterococcus faecalis</i>	15,6
	<i>Enterobacter cloacae</i>	31,3
	<i>Micrococcus luteus</i>	31,3
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	31,3
Anfotericina B ^a	<i>Candida albicans</i>	0,39
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,78

^a Controles positivos ($\mu\text{g/ml}$).
NR – Não realizado.

Além da atividade total, foram estabelecidos o percentual de atividade e o índice de susceptibilidade microbiana (ISM) (Figura 9 e 10, respectivamente).

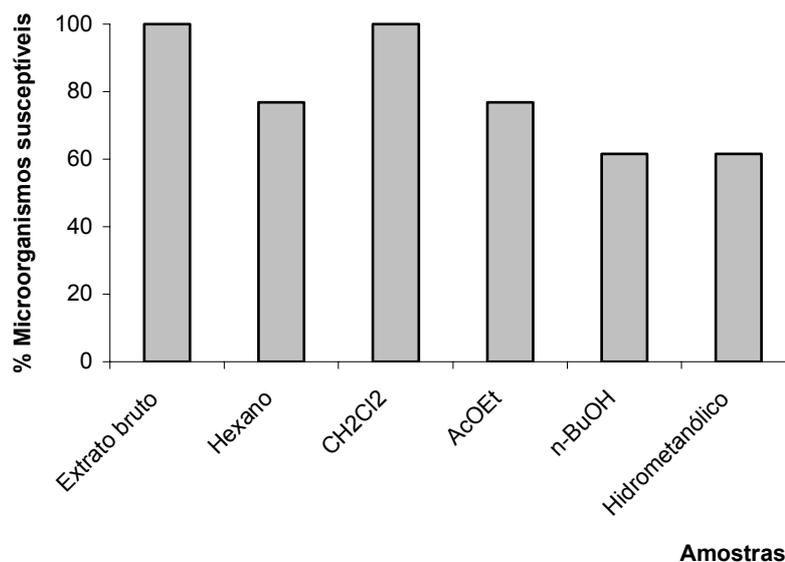


Figura 9 – Percentual de atividade do extrato bruto e das partições de *M. frigidus* em relação aos microorganismos testados.

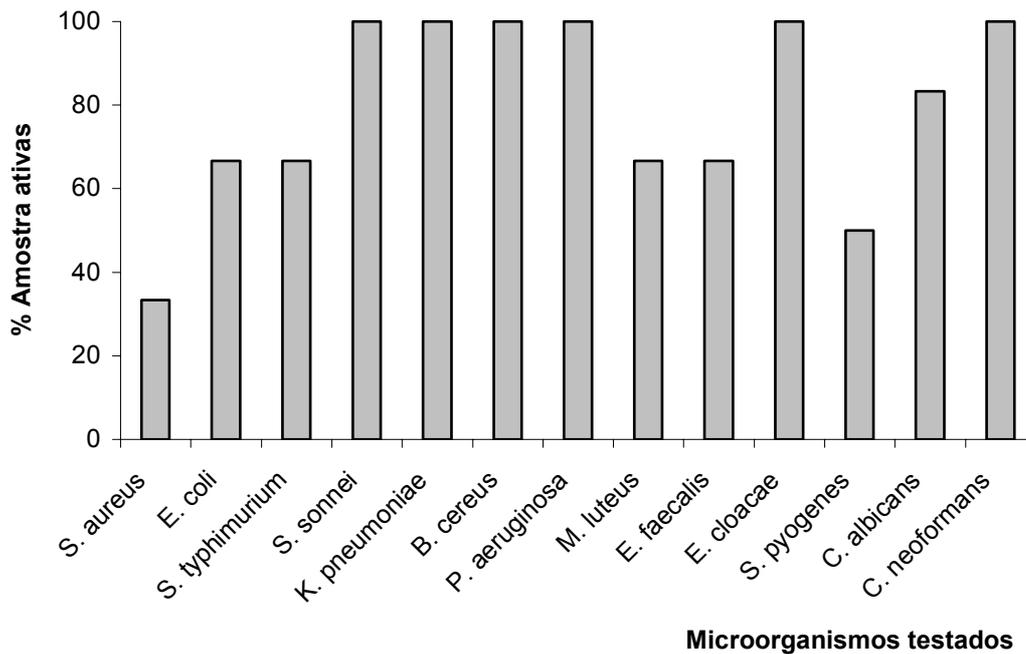


Figura 10 – ISM, índice de susceptibilidade microbiana para o extrato bruto e partições de *M. frigidus*.

Segundo Rios e Recio (2005), extratos com atividade biológica promissora devem apresentar CIM abaixo de 0,100 mg/ml. A Tabela 6 relaciona os extratos com maior atividade antimicrobiana (CIM < 0,100 mg/ml).

Tabela 6 – Concentração mínima das amostras mais ativas (CIM inferiores a 0,100 mg/ml).

Amostras	Microrganismos	CIM (mg/ml)	Atividade total (ml/g)
Extrato bruto	<i>Bacillus cereus</i>	0,078	1282
Hexano	<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,078	282
CH ₂ Cl ₂	<i>Shigella sonnei</i>	0,039	256
	<i>Bacillus cereus</i>	0,020	500
	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,039	256
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,010	1000
AcOEt	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,078	38

O percentual de atividade e o ISM também foram calculados para essas amostras (Figura 11 e 12, respectivamente).

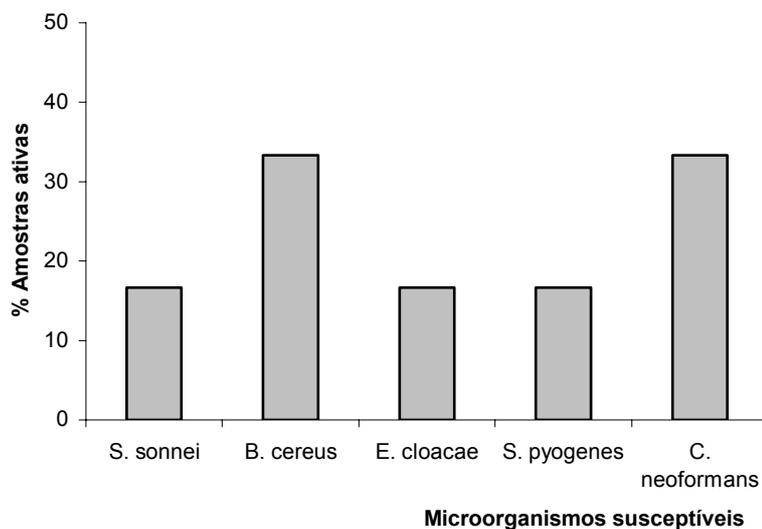


Figura 11 – ISM, índice de susceptibilidade microbiana das amostras de *M. frigidus* com CIM inferiores a 0,100 mg/ml.

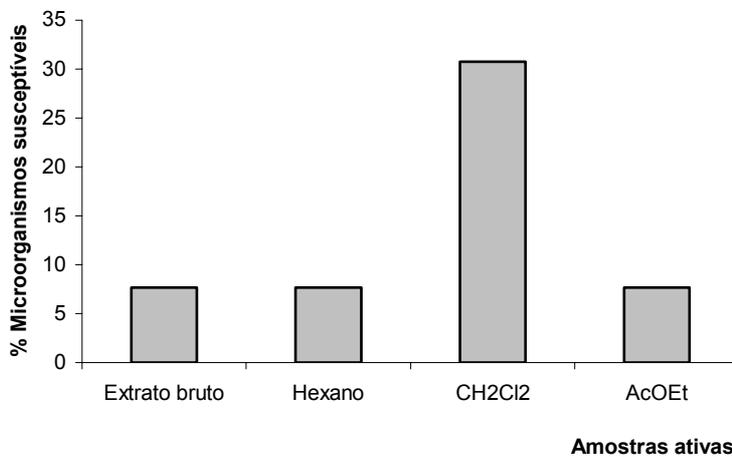


Figura 12 – Percentual de atividade antimicrobiana das amostras de *M. frigidus* com CIM inferiores a 0,100 mg/ml.

Atividade leishmanicida

Os efeitos do extrato bruto e das partições de *M. frigidus* na viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram testados e os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Atividade citotóxica para *Artemia salina*

Os resultados do teste de letalidade contra *Artemia salina* estão expressos na Tabela 7. $CL_{50} < 250,0 \mu\text{g/ml}$ foi considerado significativo para extratos vegetais (RIESER et al., 1996).

Tabela 7- Atividade leishmanicida e citotoxicidade do extrato bruto e das partições de *M. frigidus*.

Amostras	Atividade leishmanicida		Atividade citotóxica
	CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^a		CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^b
	La ^d	Lc ^d	<i>Artemia salina</i>
Extrato Bruto	58,0 ± 2,0	> 250,0	127,0 (95,0-171,0)
Hexano	40,0 ± 2,0	15,0 ± 1,0	61,0 (47,0-79,0)
CH ₂ Cl ₂	11,0 ± 1,0	7,0 ± 6,0	111,0 (93,0-133,0)
AcOEt	60,0 ± 1,0	> 250,0	> 250,0
<i>n</i> -BuOH	> 250,0	> 250,0	> 250,0
Hidrometanólico	9,0 ± 2,0	> 250,0	> 250,0
Anfotericina B ^c	0,9 ± 0,73	1,9 ± 0,25	
Timol ^c			1,4 (0,7-3,0)

^a Médias de ensaios em triplicata ± erro padrão.

^b 95% intervalo de confiança em parênteses

^c Controles positivos

^d Organismos testados: La: *Leishmania amazonensis*; Lc: *L. chagasi*.

O perfil cromatográfico do extrato bruto e das partições foi obtido por CLAE (Figuras 13).

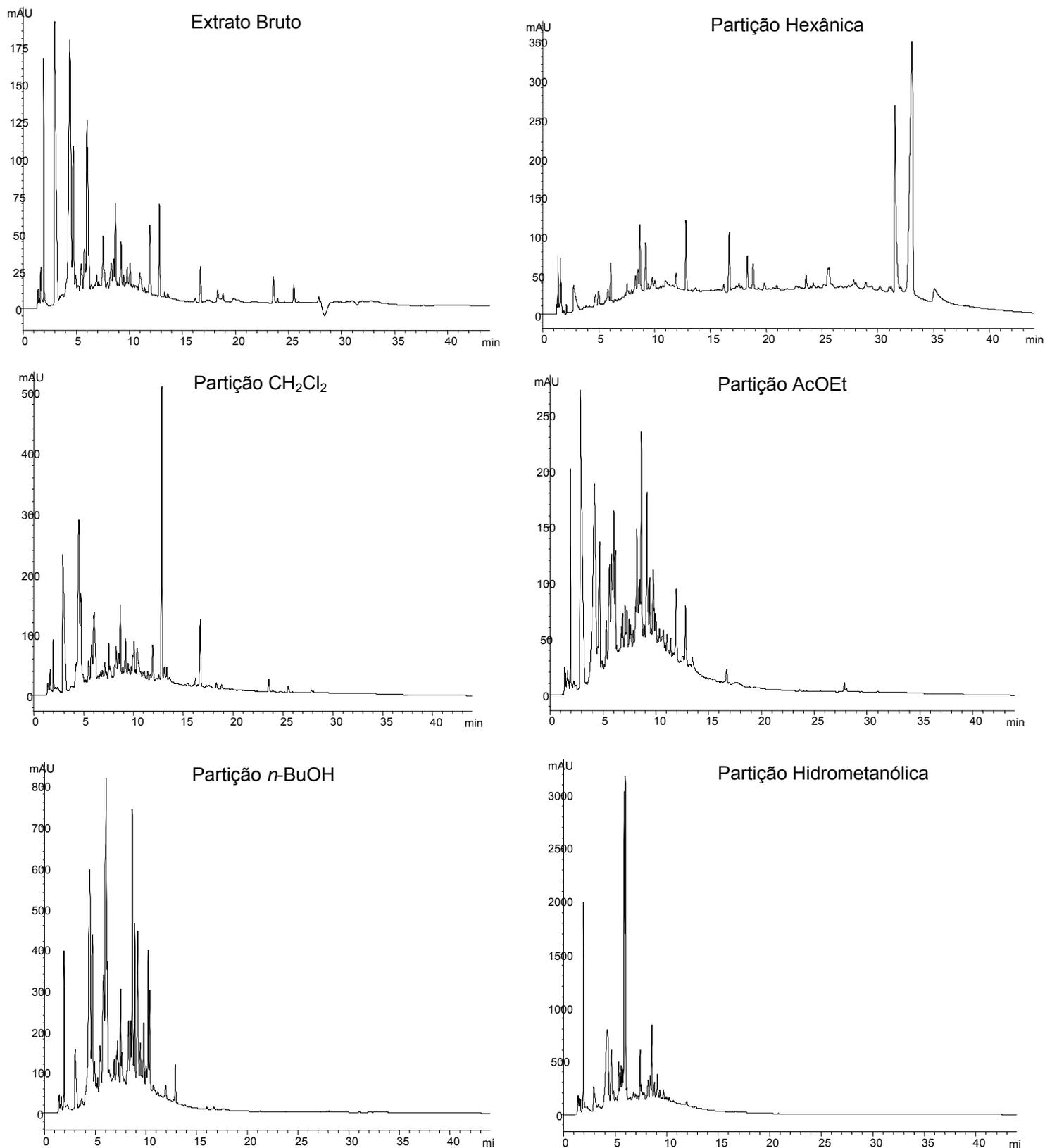


Figura 13 - Cromatograma do extrato bruto e das partições de *M. frigidus* realizado por CLAE, nas seguintes condições: coluna de fase reversa (Zorbax SB-18; 25 cm X 4,6 cm X 5 μ m); gradiente linear de solventes A (acetonitrila: água, 5:95, v/v, pH 4,0 com H₃PO₄) e B (acetonitrila: água, 90:10, v/v, pH 4,0 com H₃PO₄) variando de 0% a 100% de B em 30 min; fluxo de 1 ml/min; volume de injeção 10 μ l e a temperatura de 25°C durante a análise; detecção - 230 nm.

4.2 FRACIONAMENTO DA PARTIÇÃO CH₂Cl₂

De acordo com os resultados das atividades biológicas observados para as partições de *M. frigidus*, a partição CH₂Cl₂ se mostrou mais promissora e foi escolhida para fracionamento em coluna de sílica (Figura 3). Foram obtidas 20 frações (F₁ a F₂₀) que foram pesadas e tiveram seus rendimentos calculados (Tabela 8). As atividades citotóxica contra *A. salina*, leishmanicida e antimicrobiana dessas frações foram avaliadas e os resultados estão apresentados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

A fração F₇ foi ressuspensa em metanol. Formou-se um precipitado (F_{7L}) que foi separado do sobrenadante, ressuspensa em metanol e analisado por CCD em sílica gel GF 254 (Merck) (FM: hexano:AcOEt, 50:50, v/v; revelação: vanilina sulfúrica). Na cromatoplaça foram observadas três bandas com fatores de retenção (R_f) de 0,57; 0,50 e 0,11. As bandas com R_f de 0,57 e 0,50 apresentaram uma coloração marrom-laranja quando reveladas com ácido sulfúrico-vanilina e a banda de R_f 0,11 apresentou uma fluorescência azulada quando observada em lâmpada de UV, a 365 nm. O sobrenadante F₇ apresentou outras bandas além dessas três, se mostrando, dessa forma, mais impuro que o precipitado.

A atividade total (ml/g), o percentual de atividade e o ISM das frações estão apresentados na Tabela 11 e nas Figuras 14 e 15, respectivamente. A atividade total foi calculada somente para frações com CIM inferiores a 0,025 mg/ml. O percentual de atividade e o ISM foram calculados para frações com CIM inferiores a 0,100 mg/ml.

Tabela 8 – Peso (p/p), rendimento (% p/p) e as respectivas fases móveis em que as frações obtidas da partição CH_2Cl_2 foram eluídas.

Frações	Peso (mg)	Rendimento (% p/p)	Fase móvel
F ₁	10,0	0,21	CHCl_3 PA
F ₂	12,0	0,25	CHCl_3 : AcOEt (9:1)
F ₃	27,0	0,56	CHCl_3 : AcOEt (9:1)
F ₄	16,0	0,33	CHCl_3 : AcOEt (8:2)
F ₅	52,0	1,08	CHCl_3 : AcOEt (8:2)
F ₆	111,0	2,30	CHCl_3 : AcOEt (7:3)
F ₇	290,0	6,00	CHCl_3 : AcOEt (7:3)
F _{7L}	100,0	2,07	CHCl_3 : AcOEt (7:3)
F ₈	41,0	0,85	CHCl_3 : AcOEt (6:4)
F ₉	17,0	0,35	CHCl_3 : AcOEt (6:4)
F ₁₀	100,0	2,07	CHCl_3 : AcOEt (5:5)
F ₁₁	68,0	1,41	CHCl_3 : AcOEt (4:6)
F ₁₂	179,0	3,70	CHCl_3 : AcOEt (3:7)
F ₁₃	68,0	1,41	CHCl_3 : AcOEt (2:8)
F ₁₄	407,0	8,42	CHCl_3 : AcOEt (2:8)
F ₁₅	60,0	1,24	AcOEt PA
F ₁₆	886,0	18,33	AcOEt : MeOH (8:2)
F ₁₇	360,0	7,45	AcOEt : MeOH (7:3)
F ₁₈	140,0	2,90	AcOEt : MeOH (7:3)
F ₁₉	334,0	6,91	AcOEt : MeOH (5:5)
F ₂₀	120,0	2,48	AcOEt : MeOH (2:8)

Tabela 9 – Atividade citotóxica e leishmanicida das frações obtidas do fracionamento da partição CH₂Cl₂.

Frações	Ativ. citotóxica (CL ₅₀ - µg/ml) ^a	Ativ. leishmanicida	
		(CI ₅₀ - µg/ml) ^b	
		La ^c	Lc ^c
F ₁	> 200,0	NR	NR
F ₂	4,0 (1,0-10,0)	NR	NR
F ₃	10,0 (5,0-20,0)	NR	NR
F ₄	30,0 (15,0-38,0)	NR	NR
F ₅	19,0 (11,0-33,0)	> 250,0	18,0 ± 2,0
F ₆	2,0 (1,0-6,0)	4,0 ± 0,5	5,0 ± 0,4
F ₇	7,0 (3,0-17,0)	NR	NR
F _{7L}	7,0 (3,0-17,0)	3,0 ± 0,5	11,0 ± 0,6
F ₈	23,0 (14,0-30,0)	17,0 ± 2,9	36,0 ± 3,3
F ₉	25,0 (14,0-30,0)	NR	NR
F ₁₀	23,0 (14-30,0)	15,0 ± 1,9	46,0 ± 3,9
F ₁₁	79,0 (51,0-124,0)	9,0 ± 0,7	99,0 ± 4,9
F ₁₂	23,0 (13,0-30,0)	17,0 ± 0,2	> 250,0
F ₁₃	198,0 (142,0-274,0)	22,0 ± 2,2	> 250,0
F ₁₄	> 200,0	36,0 ± 4,0	> 250,0
F ₁₅	> 200,0	40,0 ± 0,7	> 250,0
F ₁₆	> 200,0	84,0 ± 6,9	> 250,0
F ₁₇	> 200,0	108,0 ± 10,0	> 250,0
F ₁₈	> 200,0	> 250,0	> 250,0
F ₁₉	> 200,0	> 250,0	> 250,0
F ₂₀	> 200,0	> 250,0	> 250,0

^a 95% intervalo de confiança em parênteses.

^b Média da triplicata ± desvio padrão.

^c Organismos testados: La: *Leishmania amazonensis*; Lc: *Leishmania chagasi*;

NR – Não Realizado.

Tabela 10 – Atividade antimicrobiana das frações obtidas do fracionamento da partição CH₂Cl₂.

Frações	Atividade antibacteriana ^a (CIM – mg/ml)							Atividade antifúngica ^a (CIM – mg/ml)	
	Sa	Ec	St	Ss	Kp	Bc	Pa	Ca	Cn
F ₁	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
F ₂	0,313	0,313	0,313	0,313	0,313	0,156	0,156	NR	NR
F ₃	0,078	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156	0,078	NR	NR
F ₄	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156	0,039	0,156	NR	NR
F ₅	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156	0,078	0,156	0,078	0,010
F ₆	0,156	0,039	0,005	0,010	0,010	0,039	0,005	0,020	0,005
F ₇	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
F _{7L}	0,078	0,078	0,078	0,078	0,156	0,039	0,156	0,078	0,020
F ₈	>0,313	>0,313	0,313	0,156	0,313	0,156	0,313	0,156	0,078
F ₉	0,313	0,078	0,313	0,313	0,313	0,078	0,156	0,156	0,039
F ₁₀	>0,313	>0,313	0,313	>0,313	>0,313	0,313	>0,313	>0,313	0,078
F ₁₁	0,313	0,313	0,313	0,313	0,313	0,313	0,313	0,313	0,078
F ₁₂	>0,313	>0,313	0,313	0,313	0,313	0,078	0,156	0,313	0,078
F ₁₃	0,313	0,313	0,078	0,156	0,313	0,156	0,156	0,313	0,156
F ₁₄	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156	0,039	0,078	0,313	0,156
F ₁₅	>0,313	>0,313	0,313	>0,313	>0,313	0,156	0,313	>0,313	>0,313
F ₁₆	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156	0,039	0,156	0,313	0,313
F ₁₇	>0,313	>0,313	0,313	0,313	0,313	0,156	0,313	>0,313	>0,313
F ₁₈	>0,313	>0,313	0,313	0,313	0,313	>0,313	>0,313	0,313	0,156
F ₁₉	>0,313	>0,313	0,313	>0,313	>0,313	0,313	0,313	0,156	0,313
F ₂₀	>0,313	0,156	0,156	>0,313	>0,313	0,078	>0,313	>0,313	0,313

^a Organismos testados: Sa, *Staphylococcus aureus*; Ec, *Escherichia coli*; St, *Salmonella enterica* sorovar *typhimurium*; Ss, *Shigella sonnei*; Kp, *Klebsiella pneumoniae*; Bc, *Bacillus cereus*; Pa, *Pseudomonas aeruginosa*; Ca, *Candida albicans*; Cn, *Cryptococcus neoformans*.
NR – Não Realizado.

Tabela 11 – Atividade total (ml/g) das frações da partição CH_2Cl_2 , com CIM inferiores a 0,025 mg/ml.

Amostras	Microrganismos	Atividade total
F ₅	<i>C. neoformans</i>	5,2
F ₆	<i>S. typhimurium</i>	22,0
	<i>S. sonnei</i>	11,0
	<i>K. pneumoniae</i>	11,0
	<i>P. aeruginosa</i>	22,0
	<i>C. albicans</i>	5,5
	<i>C. neoformans</i>	22,0
F _{7L}	<i>C. neoformans</i>	5,0

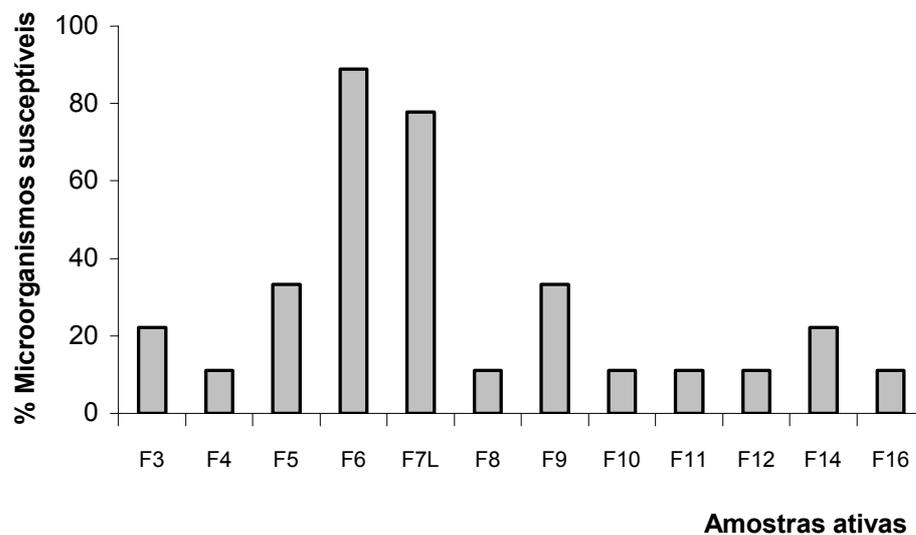


Figura 14 – Percentual de atividade das frações obtidas a partir do fracionamento da partição CH_2Cl_2 , em relação aos microrganismos susceptíveis (CIM inferiores a 0,100 mg/ml).

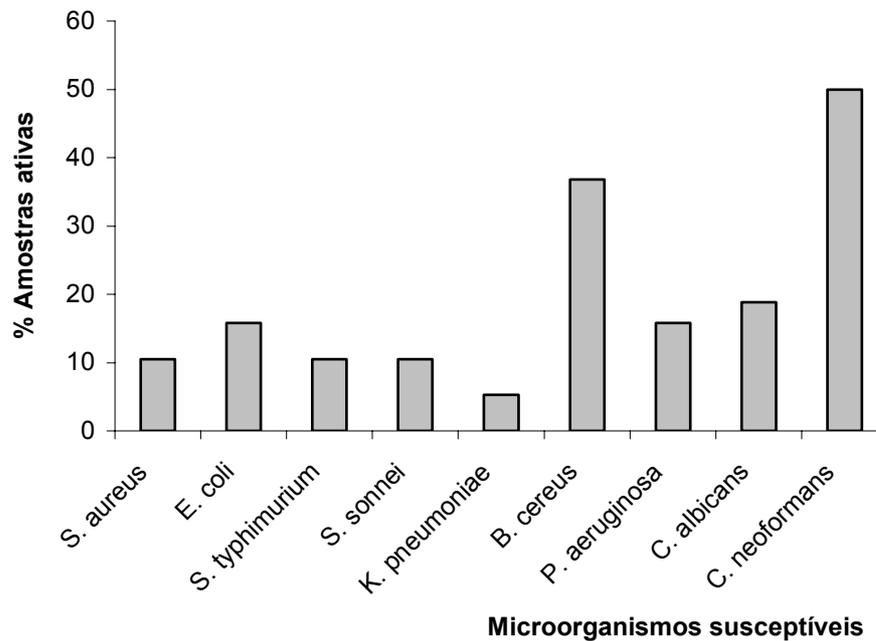


Figura 15 – ISM em relação às frações obtidas a partir do fracionamento da partição CH_2Cl_2 (CIM inferiores a 0,100 mg/ml).

As frações F_5 , F_6 e F_{7L} apresentaram expressiva atividade antifúngica e foram submetidas à bioautografia. As placas de CCD com os resultados da bioautografia estão apresentadas na Figura 16.

Halos de inibição foram observados para as duas cepas de leveduras em torno de bandas presentes nas frações F_6 com $R_f = 0,88$ e $0,75$, e F_{7L} com $R_f = 0,75$. Para *C. neoformans* foi observado mais um halo de inibição em torno da banda com $R_f = 0,63$ presente em F_6 .

Utilizando reveladores específicos foi possível identificar as classes químicas dos constituintes presentes nas bandas que apresentaram inibição antifúngica. As bandas com $R_f 0,75$ e $0,63$ apresentaram coloração roxa quando reveladas com o Reativo de Liebermann-Burchard, indicando a presença de triterpenóides. A banda com $R_f 0,88$ apresentou coloração alaranjada quando revelada com o Reativo de Dragendorff, característica de alcalóides.

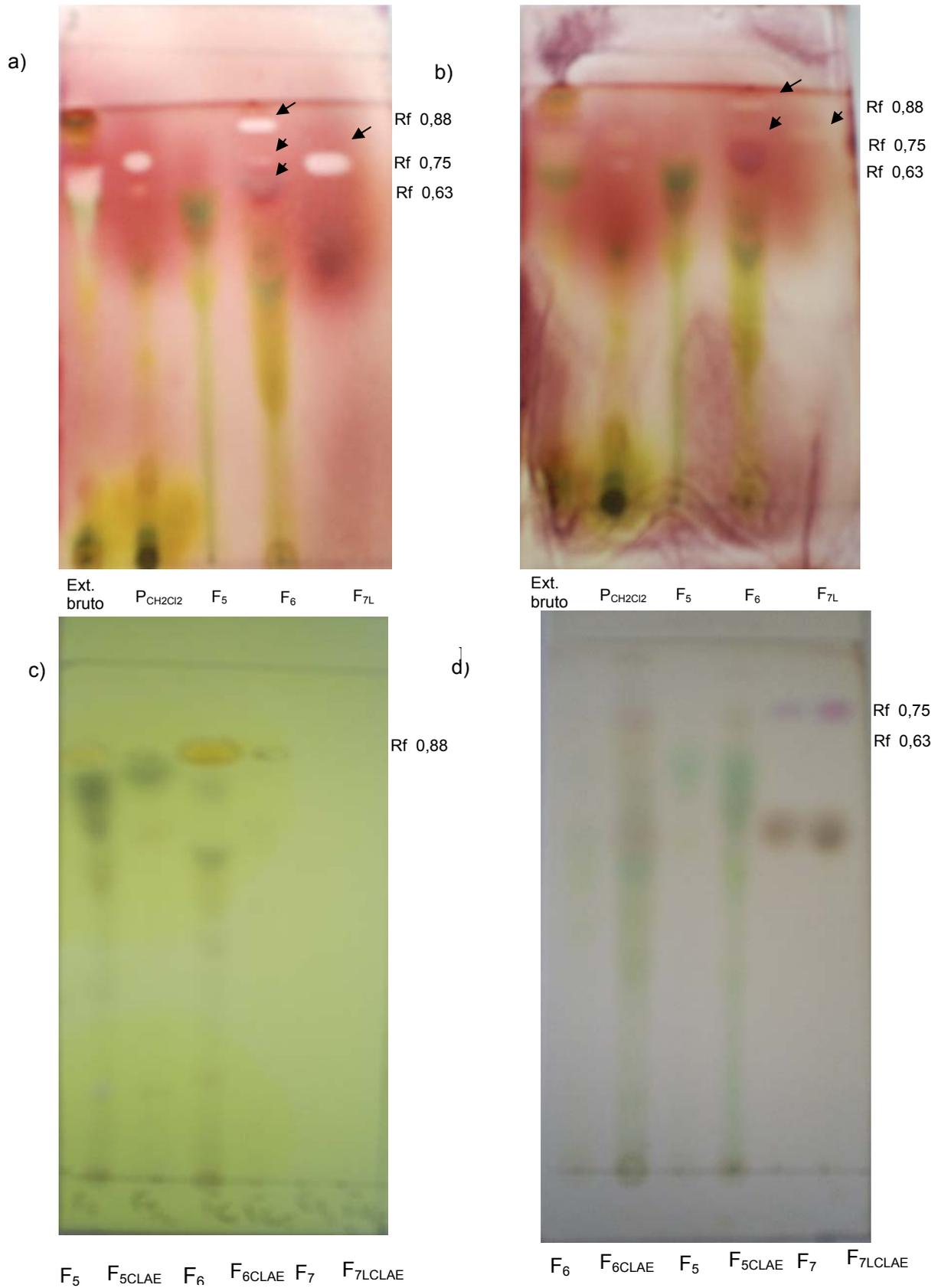
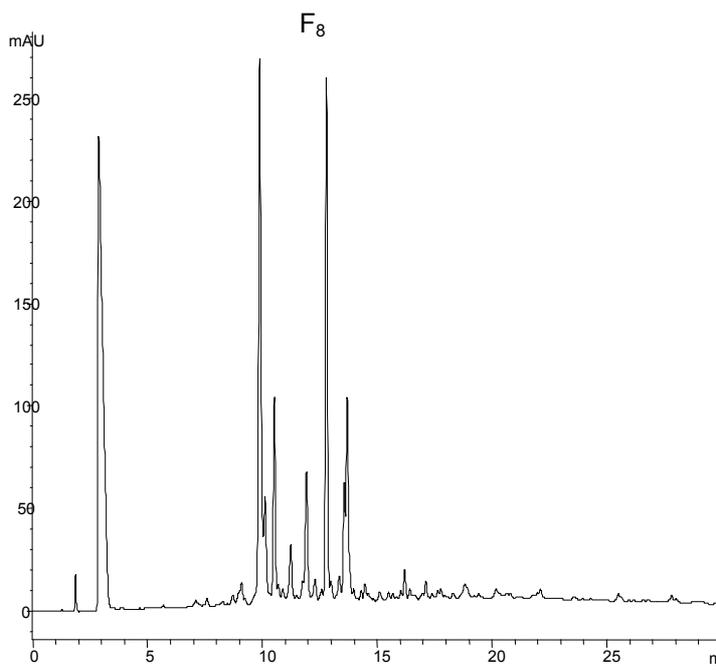
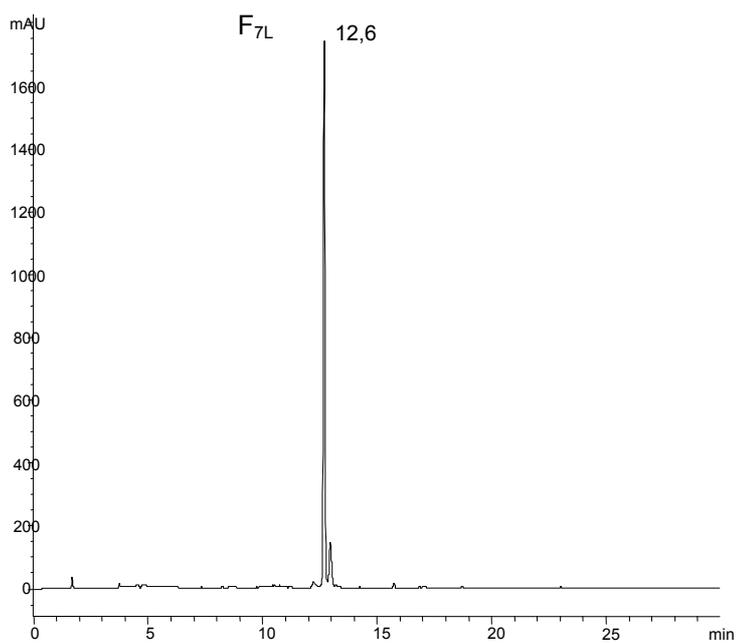
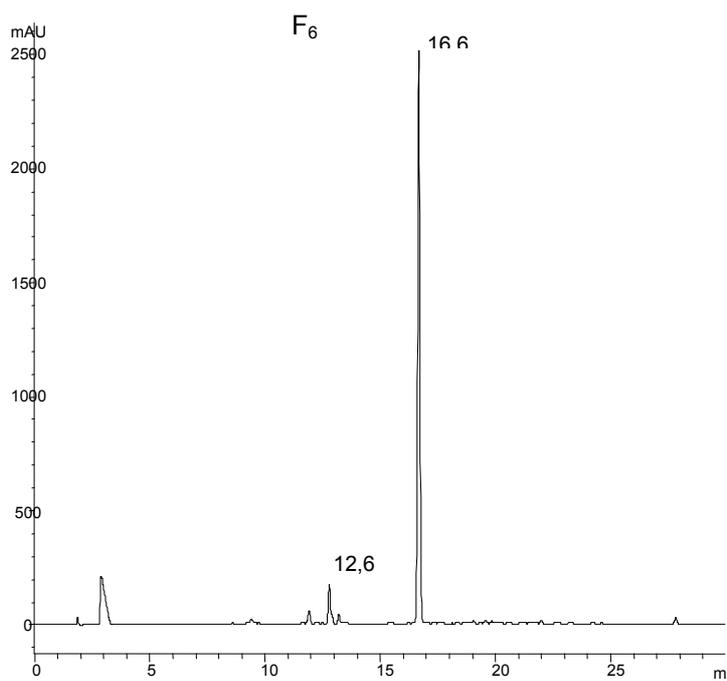
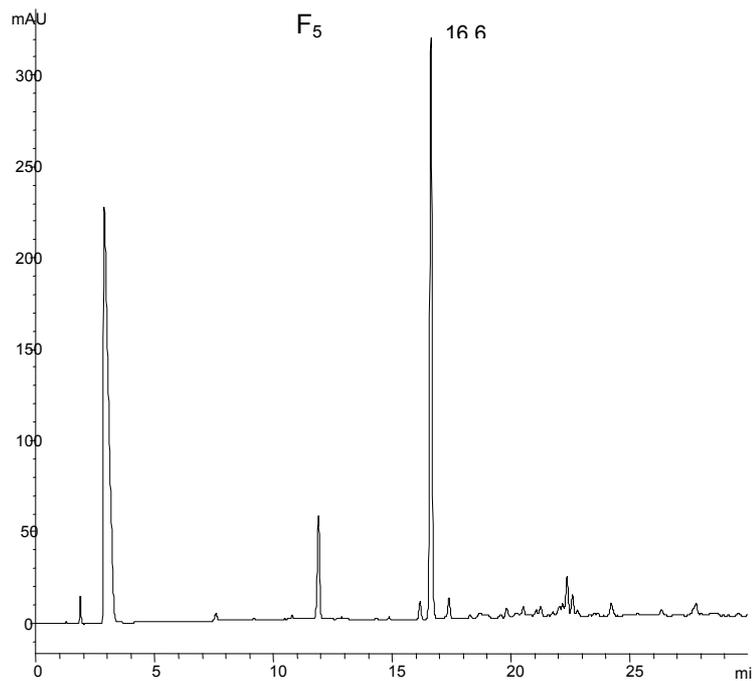
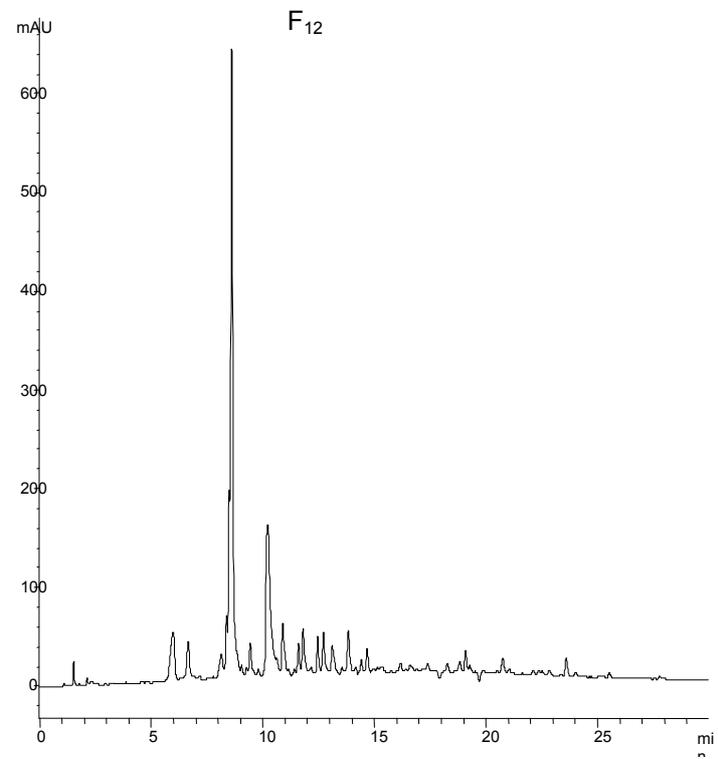
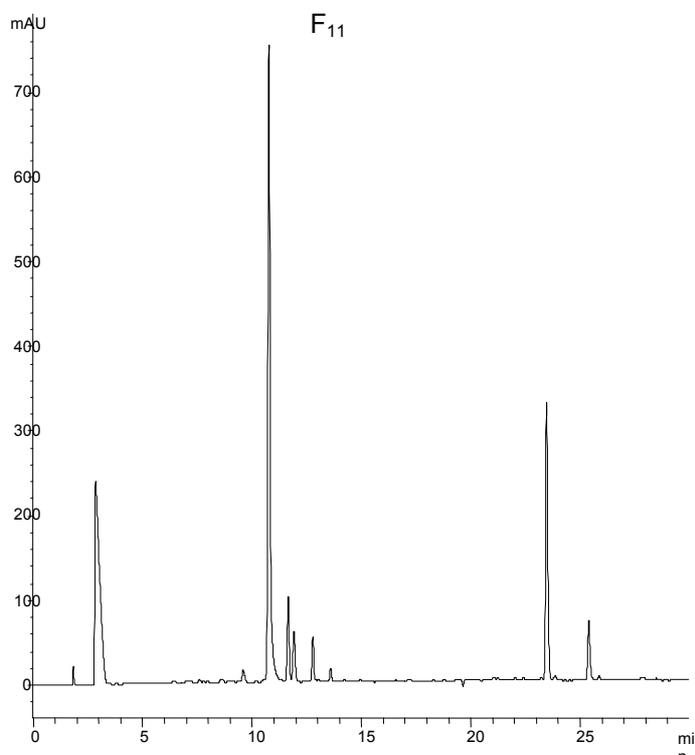
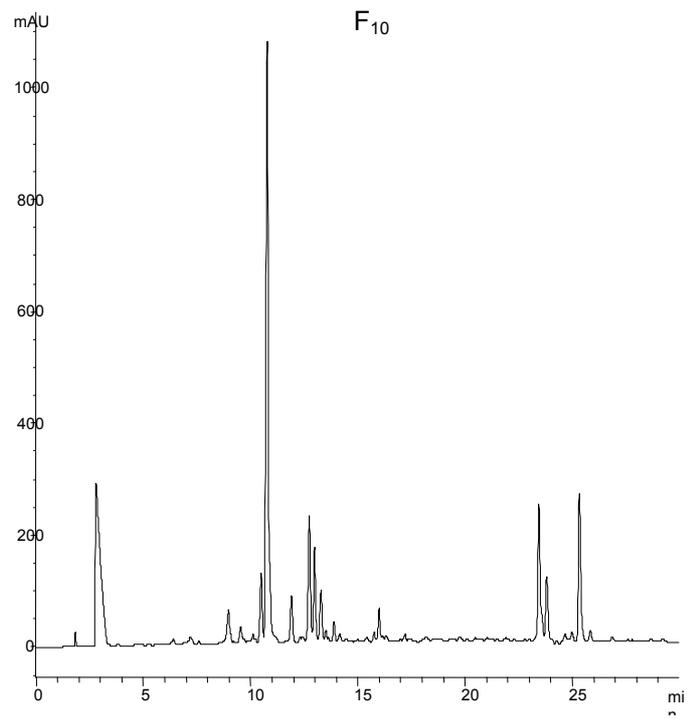
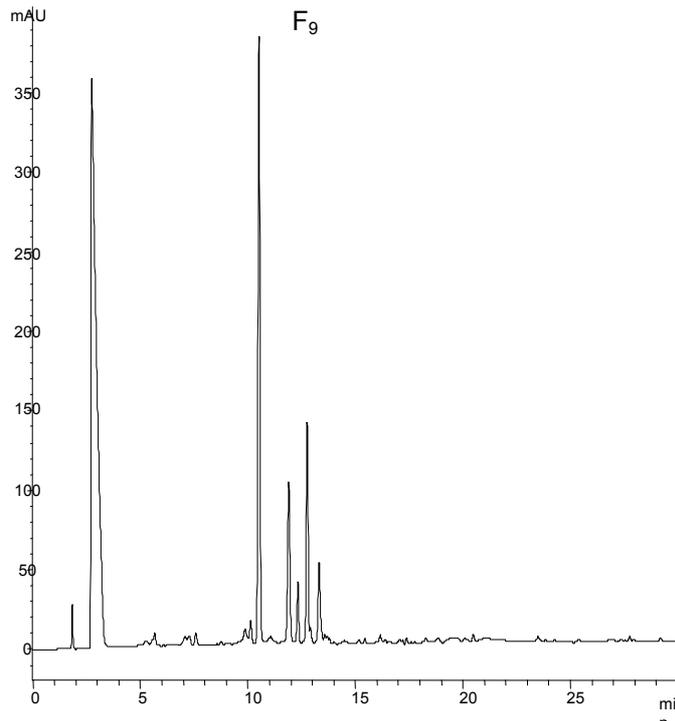


Figura 16 – Bioautografia do extrato bruto, partição CH₂Cl₂ e das frações F₅, F₆ e F_{7L} (FM: hexano:AcOEt, 40:60, v/v, revelação INP). a) *C. neoformans* e b) *C. albicans*. CCD das amostras reveladas com: c) Dragendorff e d) Liebermann-Burchard.

4.3 PERFIS CROMATOGRÁFICOS DAS FRAÇÕES ATIVAS

As frações obtidas do fracionamento da partição CH_2Cl_2 que apresentaram atividade nos modelos biológicos utilizados (F_5 a F_{16}) tiveram seus perfis cromatográficos analisados em CLAE (Figuras 17).





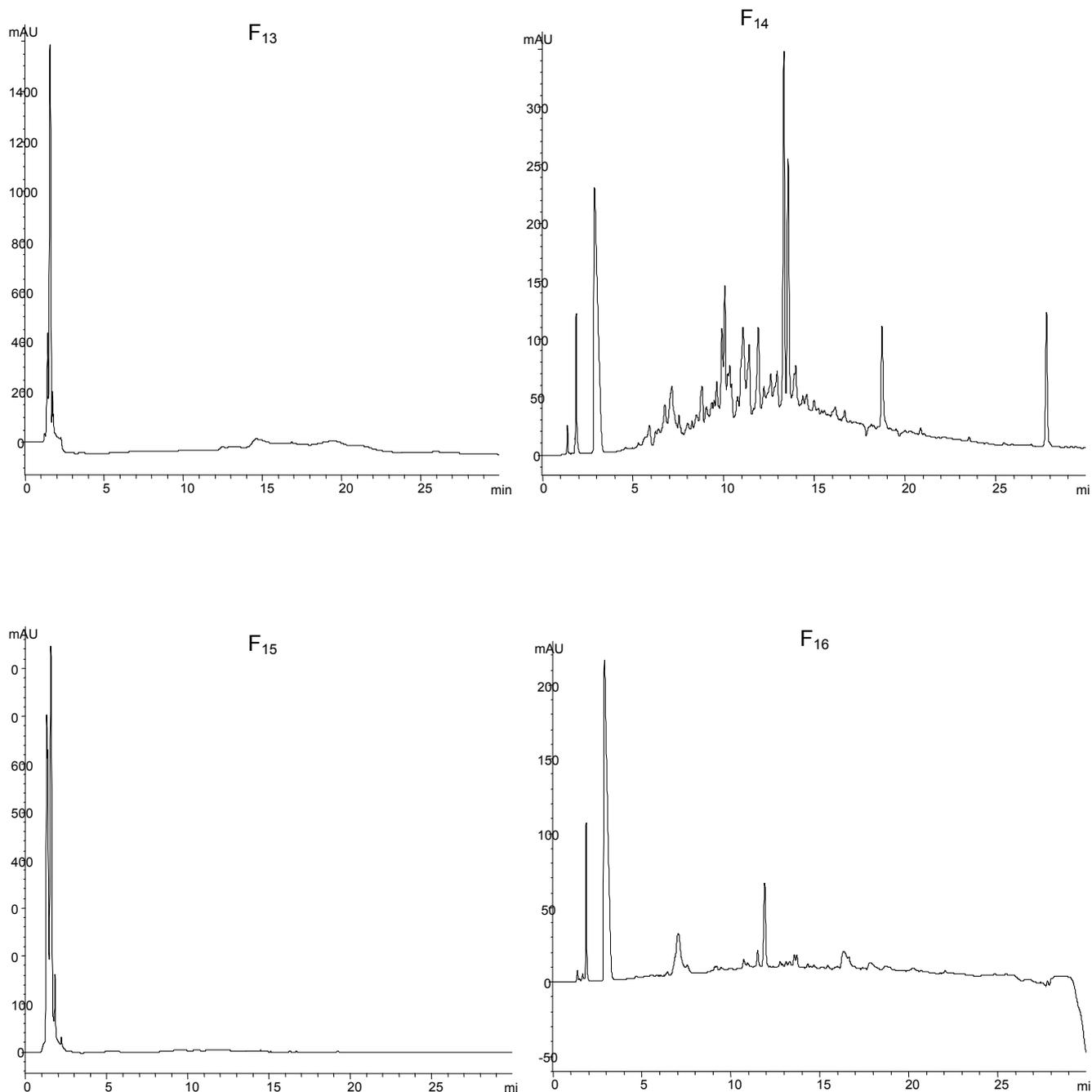


Figura 17 - Cromatograma das frações de F₅ a F₁₆ da partição CH₂Cl₂ de *M. frigidus* realizado por CLAE, nas seguintes condições: coluna de fase reversa (Zorbax SB-18; 25 cm X 4,6 cm X 5 µm); gradiente linear de solventes A (acetonitrila: água, 5:95, v/v, pH 4,0 com H₃PO₄) e B (acetonitrila; água, 90:10, v/v, pH 4,0 com H₃PO₄) variando de 0% a 100% de B em 30 min; fluxo de 1 ml/min; volume de injeção 10µl e a temperatura de 25°C durante a análise; detecção - 230 nm.

As frações mais ativas (F₅ a F₁₆) também foram analisadas por CCD para identificação dos componentes químicos presentes (Tabela 12).

Tabela 12 – Constituintes presentes nas frações mais ativas da partição CH₂Cl₂.

Frações	Constituintes presentes*
F ₅	Triterpeno, esteróide, antraquinona, alcalóide, flavonóide.
F ₆	Triterpeno, esteróide, antraquinona, alcalóide, flavonóide.
F _{7L}	Triterpeno e flavonóide.
F ₈	Triterpeno, antraquinona e flavonóide.
F ₉	Triterpeno e flavonóide.
F ₁₀	Triterpeno e flavonóide.
F ₁₁	Antraquinona e flavonóide.
F ₁₂	Antraquinona e glicosídeo flavônico.
F ₁₃	Triterpeno e glicosídeo flavônico.
F ₁₄	Triterpeno, esteróide, antraquinona, antrona e glicosídeo flavônico.
F ₁₅	Triterpenos, antrona e glicosídeo flavônico.
F ₁₆	Esteróide, antrona e glicosídeo flavônico.

* Reveladores utilizados: KOH 10% (reativo de Borntraegger); Reativo de Dragendorff; NP/PEG e Liebermann-Burchard.

4.4 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO ppt_{MeOH}

As etapas de extração de alcalóides estão representadas na Figura 4.

As amostras ppt_{hex} e o ppt_{MeOH}, apresentaram características organolépticas, cromatográficas e biológicas diferentes. O ppt_{hex} apresentou-se como um pó branco solúvel em água ou solução de acetonitrila:água (7:3, v/v). Em CCD foram observadas duas bandas com R_f de 0,75 e 0,13 sendo aquela com R_f maior revelada com o Reativo de Dragendorff, indicando a presença de alcalóides.

O ppt_{MeOH} apresentou-se como uma amostra escura pastosa, solúvel em metanol. O fracionamento em coluna de Sephadex LH 20 do ppt_{MeOH} forneceu 10 frações (F_{1A} a F_{10A}) que foram submetidas a CCD. A cromatoplaça foi revelada com o reativo de Dragendorff e observou-se que os alcalóides concentraram-se na fração F_{2A} (Figura 18). As amostras ppt_{hex} e ppt_{MeOH} e as frações F_{2A} foram submetidas à

CLAE (Figuras 19). O rendimento de ppt_{hex} , ppt_{MeOH} e das frações de F_{1A} a F_{10A} estão representados na Tabela 13.

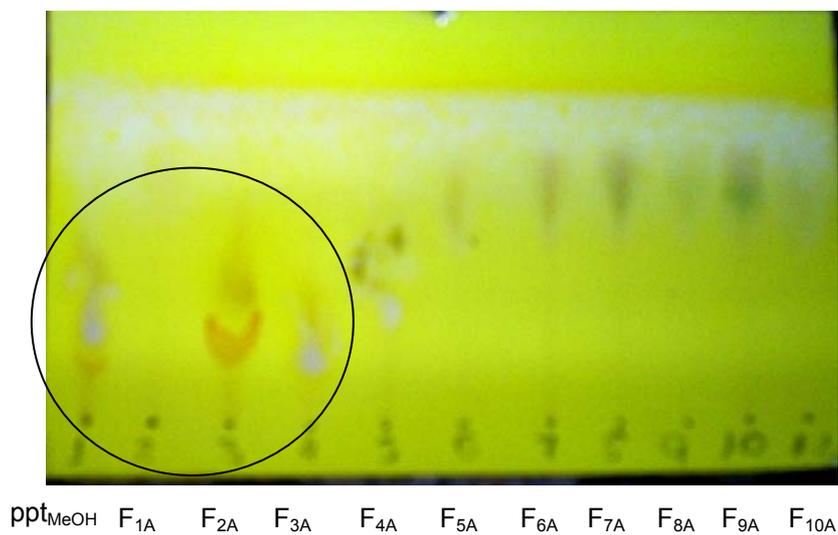


Figura 18 – CCD de ppt_{MeOH} e das suas frações (FM: MeOH: ácido acético, 8:2, v/v; revelador: Reativo de Dragendorff)

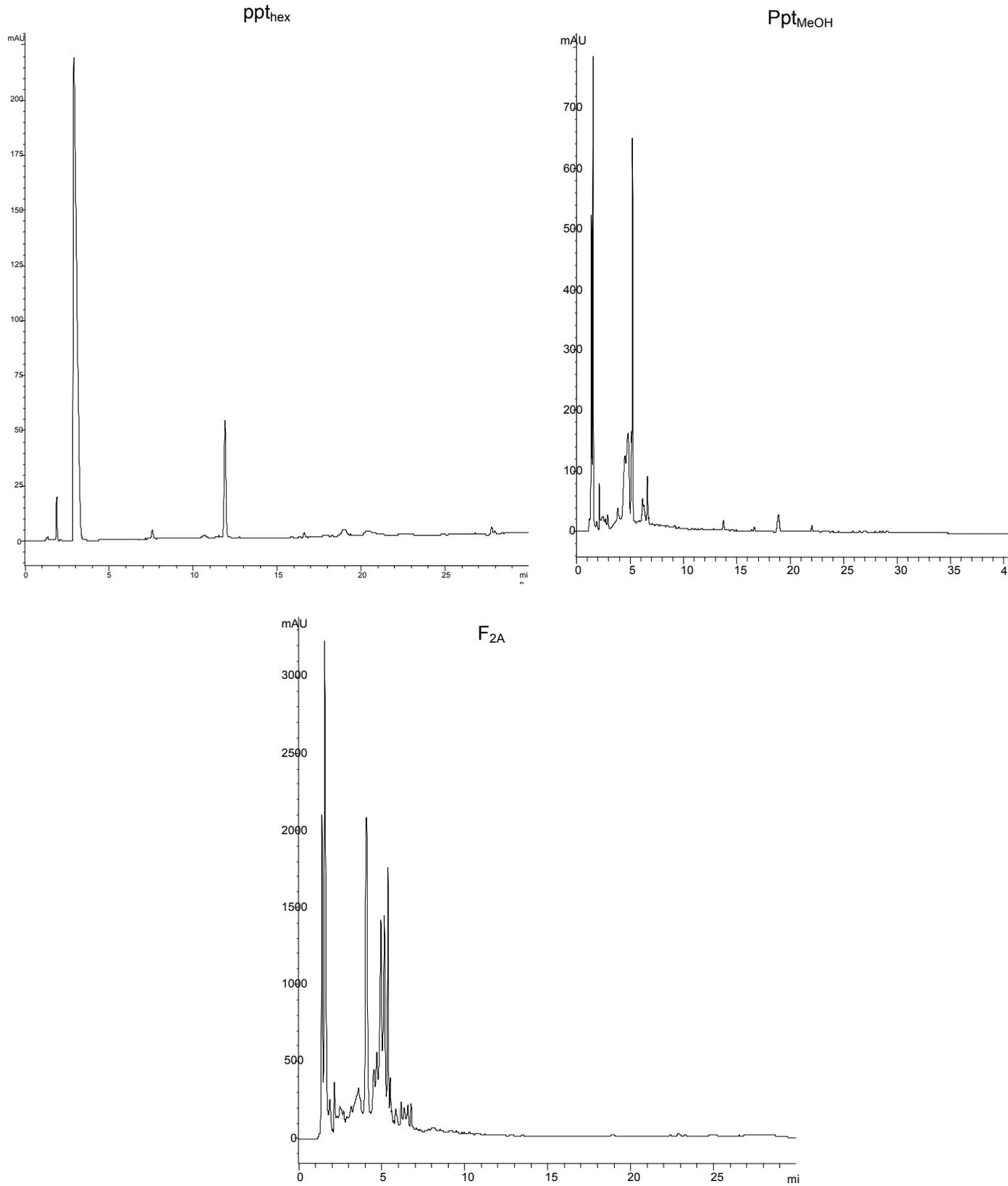


Figura 19 - Cromatograma de ppt_{hex}, ppt_{MeOH} e da fração F_{2A} extraídas de *M. frigidus* realizado por CLAE, nas seguintes condições: coluna de fase reversa (Zorbax SB-18; 25 cm X 4,6 cm X 5 µm); gradiente linear de solventes A (acetonitrila: água, 5:95, v/v, pH 4,0 com H₃PO₄) e B (acetonitrila; água, 90;10, v/v, pH 4,0 com H₃PO₄) variando de 0% a 100% de B em 30 min; fluxo de 1 ml/min; volume de injeção 10µl e a temperatura de 25°C durante a análise; detecção - 230 nm.

A amostra ppt_{MeOH}, suas frações e ppt_{hex} foram submetidas à avaliação das atividades citotóxica contra *Artemia salina*, leishmanicida e antimicrobiana (Tabela 14).

As amostras testadas não apresentaram atividade contra *Artemia salina* e formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, com exceção da F_{3A} que apresentou uma moderada atividade citotóxica (CL₅₀ 236,0 µg/ml).

As frações apresentaram atividade contra as cepas de bactérias e fungos. Resultados apresentados na Tabela 14.

A atividade total (ml/g), o percentual de atividade e o ISM das amostras que apresentaram CIM menores que 0,100 mg/ml estão apresentados na Tabela 15 e nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

Tabela 13 – Rendimento de ppt_{hex}, ppt_{MeOH} e as frações obtidas do seu fracionamento.

Amostras	Peso (mg)	Rendimento (% p/p)
ppt _{hex}	30,0	0,0023*
ppt _{MeOH}	1300,0	10*
F _{1A}	10,0	0,77**
F _{2A}	644,0	49,54**
F _{3A}	350,0	26,92**
F _{4A}	50,0	3,85**
F _{5A}	30,0	2,31**
F _{6A}	56,0	4,30**
F _{7A}	13,0	1,00**
F _{8A}	50,0	3,85**
F _{9A}	47,0	3,62**
F _{10A}	6,0	0,46**

* Rendimento em relação ao extrato bruto (1,3 Kg).

** Rendimento relativo ao ppt_{MeOH} (1,3g).

Tabela 14 – Atividade antimicrobiana dos ppt_{hex}, ppt_{MeOH} e as frações obtidas do seu do fracionamento.

Amostras	Atividade antibacteriana (CIM – mg/ml) ^a							Atividade antifúngica (CIM – mg/ml) ^a	
	Sa	Ec	St	Ss	Kp	Bc	Pa	Ca	Cn
ppt _{hex}	>0,313	>0,313	>0,313	>0,313	0,313	0,313	>0,313	>0,313	0,156
ppt _{MeOH}	0,156	0,313	0,313	0,313	0,313	0,156	0,313	0,313	0,078
F _{1A}	0,039	0,313	0,039	0,078	0,156	0,039	0,039	0,313	0,156
F _{2A}	0,313	0,313	0,313	0,313	0,313	0,039	0,039	0,313	0,039
F _{3A}	>0,313	>0,313	>0,313	>0,313	0,313	0,039	0,156	0,156	0,078
F _{4A}	0,156	0,313	0,313	0,313	0,313	0,078	0,078	0,156	0,078
F _{5A}	>0,313	>0,313	0,156	0,156	0,313	0,078	0,078	0,156	0,156
F _{6A}	>0,313	>0,313	0,156	0,313	0,313	0,156	0,156	>0,313	>0,313
F _{7A}	0,156	0,313	0,313	>0,313	>0,313	>0,313	>0,313	0,313	0,313
F _{8A}	>0,313	>0,313	0,156	0,078	0,156	0,156	0,078	0,313	0,078
F _{9A}	0,156	0,313	0,313	>0,313	>0,313	0,313	0,313	>0,313	>0,313
F _{10A}	0,156	0,313	0,313	>0,313	>0,313	>0,313	>0,313	>0,313	>0,313

^a Organismos testados: Sa, *Staphylococcus aureus*; Ec, *Escherichia coli*; St, *Salmonella enterica* sorovar *typhimurium*; Ss, *Shigella sonnei*; Kp, *Klebsiella pneumoniae*; Bc, *Bacillus cereus*; Pa, *Pseudomonas aeruginosa*; Ca, *Candida albicans*; Cn, *Cryptococcus neoformans*.

Tabela 15 – Atividade total (ml/g) de ppt_{hex}, ppt_{MeOH} e das frações obtidas do seu do fracionamento com CIM inferiores a 0,100 mg/ml.

Amostras	Microrganismos	Atividade total
Ppt _{MeOH}	<i>C. neoformans</i>	12,82
F _{1A}	<i>S. aureus</i>	0,20
	<i>S. typhimurium</i>	0,20
	<i>S. sonnei</i>	0,10
	<i>B. cereus</i>	0,20
	<i>P. aeruginosa</i>	0,20
F _{2A}	<i>B. cereus</i>	12,70
	<i>P. aeruginosa</i>	12,70
	<i>C. neoformans</i>	12,70
F _{3A}	<i>B. cereus</i>	6,90
	<i>C. neoformans</i>	3,45
F _{4A}	<i>B. cereus</i>	0,49
	<i>P. aeruginosa</i>	0,49
	<i>C. neoformans</i>	0,49
F _{5A}	<i>B. cereus</i>	0,29
	<i>P. aeruginosa</i>	0,29
F _{8A}	<i>S. sonnei</i>	0,29
	<i>P. aeruginosa</i>	0,29
	<i>C. neoformans</i>	0,29

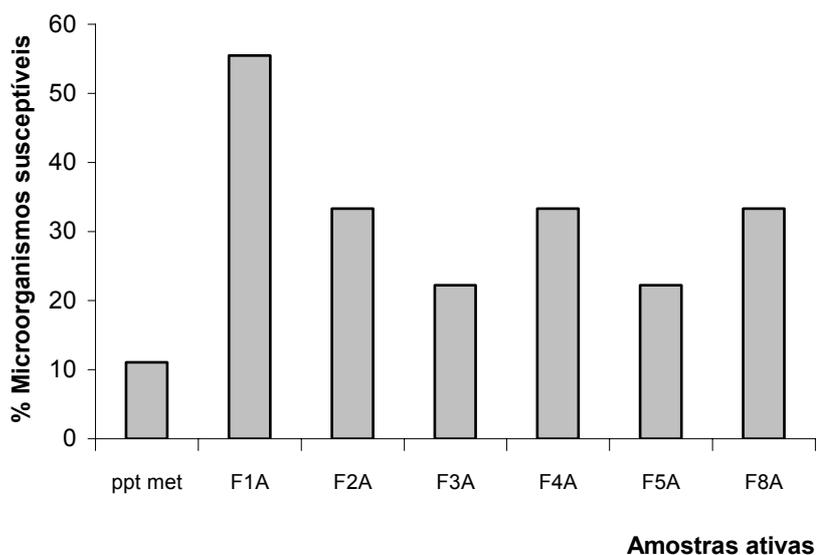


Figura 20 – Percentual de atividade do pptM_{eOH} e das frações obtidas do seu fracionamento em relação aos microrganismos mais susceptíveis (CIM inferiores a 0,100 mg/ml).

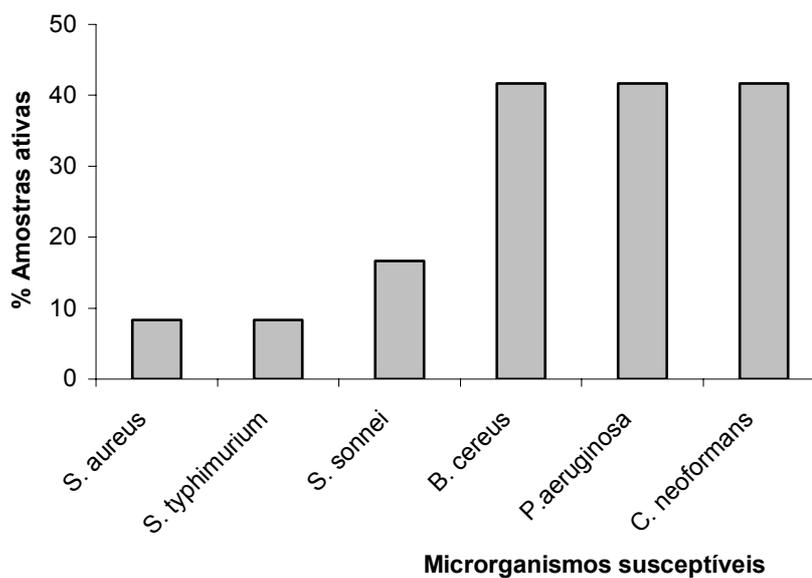


Figura 21 – ISM, índice de susceptibilidade microbiana das amostras com CIM inferiores 0,100 mg/ml.

4.5 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO ÓLEO DAS PARTES AÉREAS DE *M. frigidus*

A hidrodestilação das partes aéreas de *M. frigidus* forneceu um óleo de cor alaranjada com um rendimento de 0,01% (v/p). O óleo foi analisado por CG-EM (Figura 22). Utilizando o banco de dados do aparelho (“Software” AMDIS, versão 2.1) foram identificadas 9 das 12 substâncias presentes no óleo de *M. frigidus* (Tabela 16), sendo que o linalol (29,29%) e o acetato de eugenol (15,85%) foram as substâncias majoritárias. As fórmulas estruturais e os espectros de massa estão representados na Figura 23. Já as fórmulas moleculares e as massas moleculares dos constituintes do óleo de *M. frigidus* estão representados na Tabela 16.

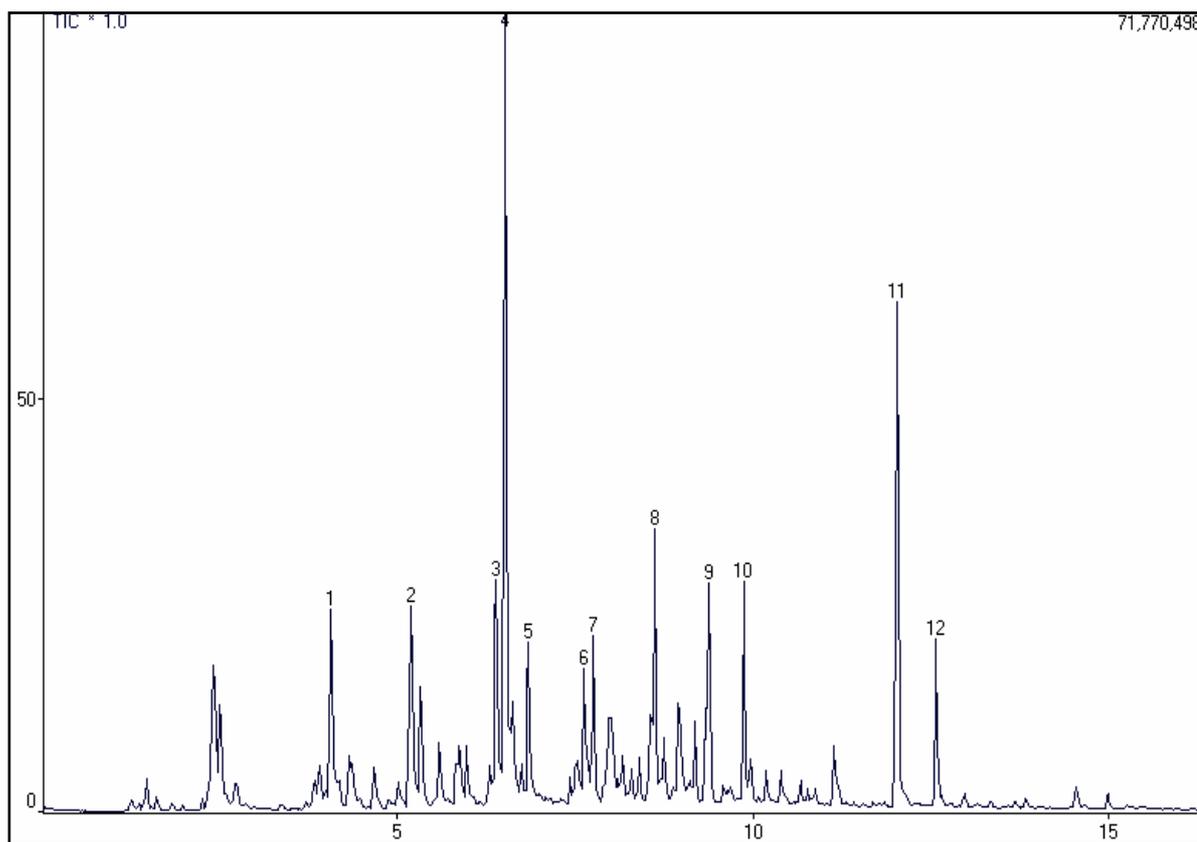
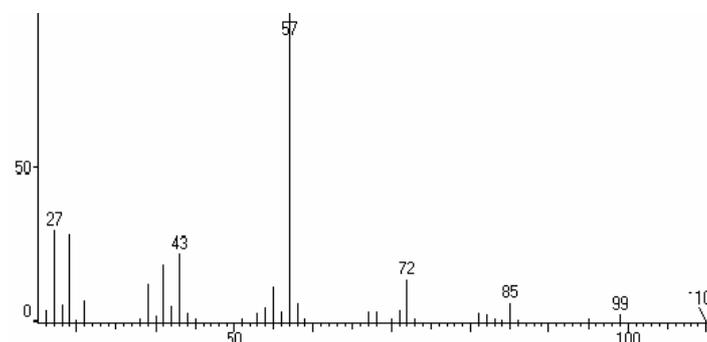
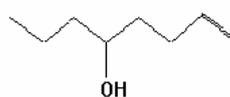
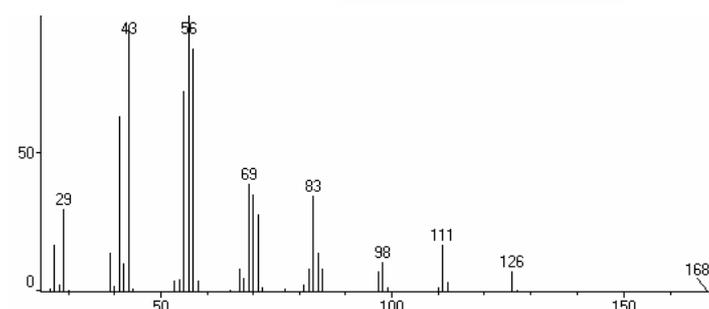
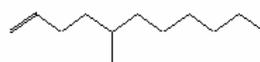
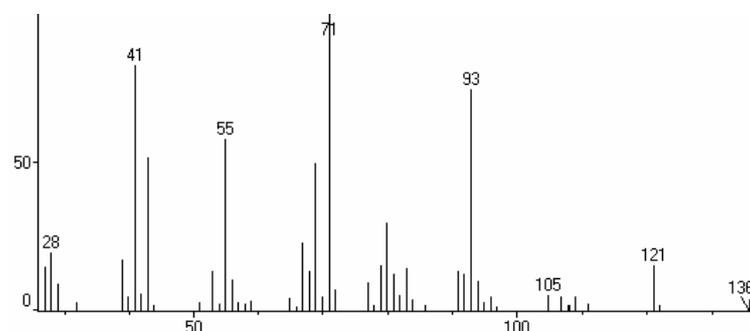


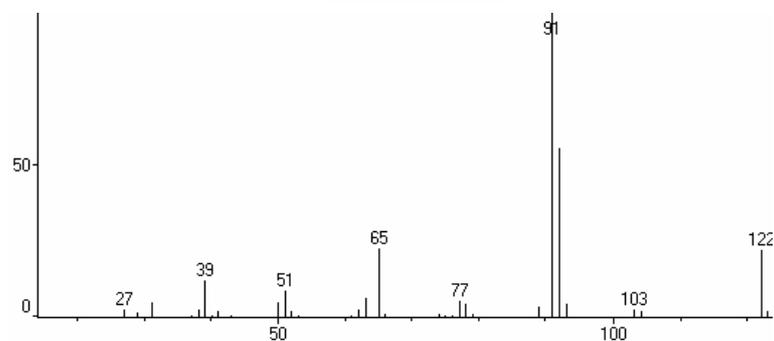
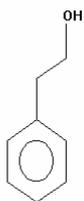
Figura 22 – Perfil cromatográfico do óleo essencial das partes aéreas de *M. frigidus* por CG.

Tabela 16- Composição química do óleo essencial de *M. frigidus*

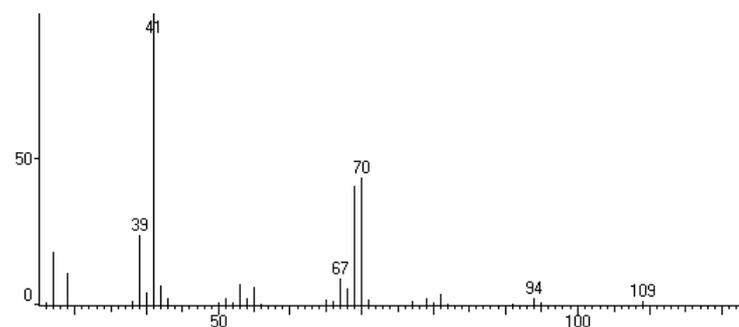
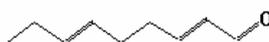
Nº do pico ^a	Compostos	Tempo de Retenção (min)	%	Fórmula molecular	Massa molecular
1	7-Octen-4-ol	4,065	5,03	C ₈ H ₁₆ O	128
2	Não identificado	5,196	8,41		276
3	5-metil-1-Undecene	6,392	7,69	C ₁₂ H ₂₄	168
4	Linalol	6,532	29,29	C ₁₀ H ₁₈ O	154
5	Álcool β-fenil etílico (β-PEA)	6,849	3,79	C ₈ H ₁₀ O	122
6	2,6-Nonadienal	7,633	3,55	C ₉ H ₁₄ O	138
7	Trans-2-Nonenal	7,770	4,83	C ₉ H ₁₆ O	140
8	Salicilato de metila	8,614	6,55	C ₈ H ₈ O ₃	152
9	Não identificado	9,379	4,66		281
10	Não identificado	9,867	5,99		341
11	Acetato de eugenol	12,035	15,85	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	206
12	Damascenona	12,583	4,36	C ₁₃ H ₁₈ O	190

^a Relacionado com o cromatograma apresentado na figura 23.

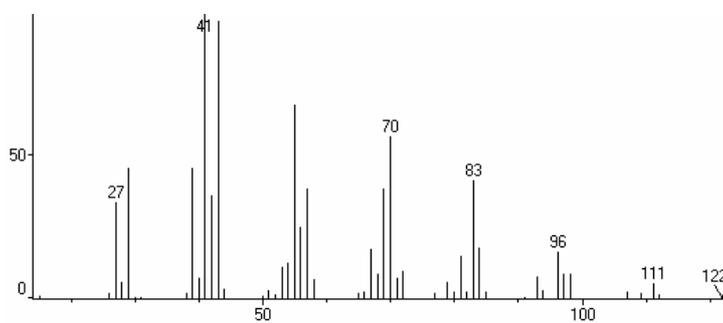
7-octen-4-ol**5-metil-1-Undeceno****Linalol**

β -PEA

2,6-Nonadienal



Trans-2-nonenal



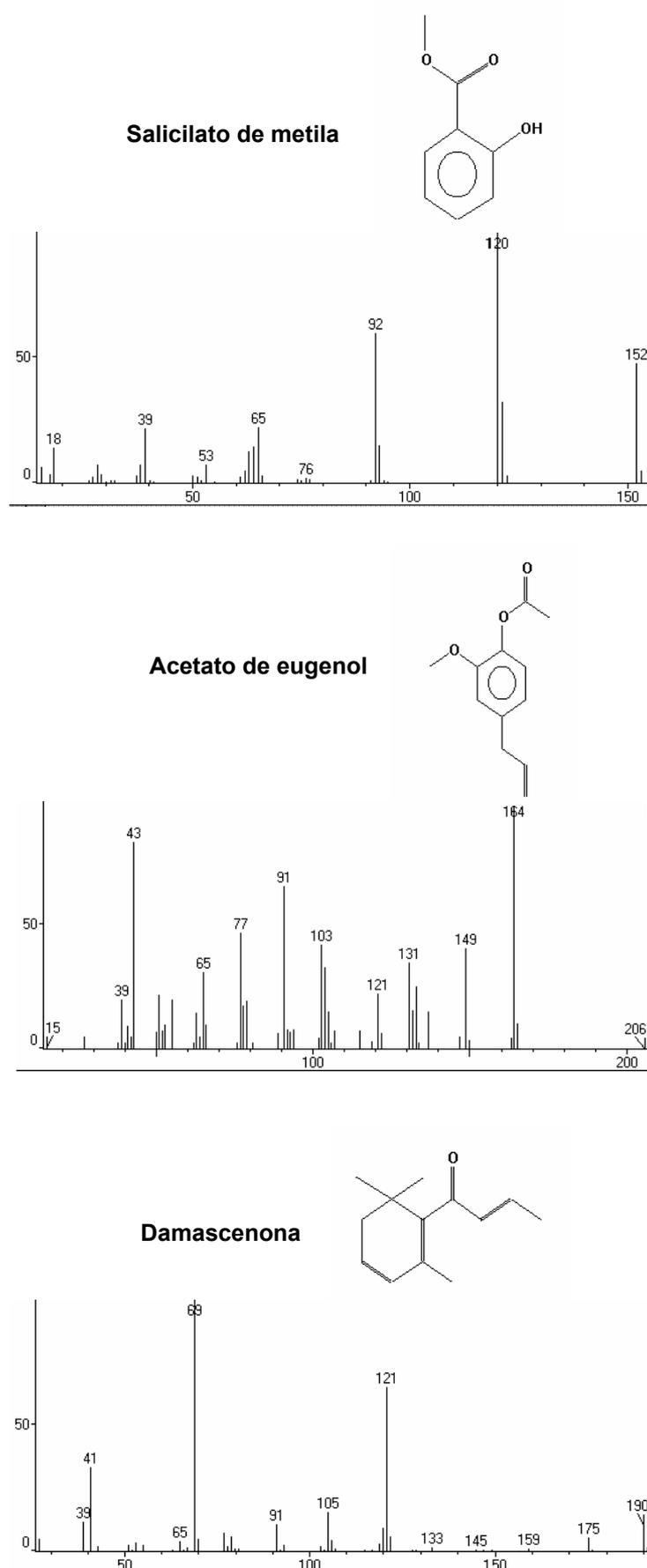


Figura 23 – Fórmula estrutural e o espectro de massa dos constituintes presentes no óleo de *M. frigidus*.

O óleo essencial teve sua atividade antimicrobiana testada pelo método de microdiluição. Os resultados estão expressos na Tabela 17.

Tabela 17– Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. frigidus*.

Microrganismos testados	CIM (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,250
<i>Escherichia coli</i>	0,500
<i>Salmonella typhimurium</i>	1,000
<i>Shigella sonnei</i>	1,000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,500
<i>Bacillus cereus</i>	0,250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,250
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,250
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,000
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,500
<i>Candida albicans</i>	0,063
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,008

O efeito do óleo essencial de *M. frigidus* na viabilidade de *L. amazonensis* e *L. chagasi* também foi avaliado e os CI_{50} para as formas promastigotas de ambas espécies de *Leishmania* foram $> 50 \mu\text{g/ml}$.

Para *Artemia salina* apresentou CL_{50} 88,0 (60,0-128,0) $\mu\text{g/ml}$.

O resultado da atividade antioxidante, pelo método do DPPH, expresso em CI_{50} foi de 38,0 (24,0-68,0) $\mu\text{g/ml}$.

Como a atividade antifúngica do óleo foi muito próxima das frações F_6 e F_{7L} , foi realizado CCD (fase móvel: hexano: AcOEt, 60:40, v/v, revelada com ácido sulfúrico/vanilina) para verificar se são as mesmas substâncias ativas (Figura 24).



Figura 24 – CCD do óleo e das frações F₆ e F_{7L} extraídas de *M. frigidus* (fase móvel: hexano:AcOEt, 60:40, v/v, revelada com ácido sulfúrico/vanilina).

5 DISCUSSÃO

5.1 FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO BRUTO E PARTIÇÕES DE *M. frigidus*

Estudo fitoquímico

Por meio de estudos fitoquímicos e da determinação dos teores de compostos fenólicos e de flavonóides, foi possível identificar e quantificar as principais classes de constituintes químicos presentes no extrato bruto e nas partições de *M. frigidus* e também correlacionar sua constituição química com as atividades biológicas encontradas. Flavonóides e flavononas foram observados no extrato e em todas as partições. Dessa forma, os teores de fenólicos totais e flavonóides foram determinados. A partição AcOEt apresentou os maiores teores desses constituintes, seguido pelas partições *n*-BuOH e hidrometanólica. Uma correlação entre os conteúdos de fenólicos e flavonóides também foi observada, o que indica que os flavonóides representam a classe majoritária de fenólicos presentes nas amostras.

Os flavonóides são substâncias fenólicas de baixo peso molecular que possuem geralmente de média a alta polaridade. Podem ocorrer livres ou glicosilados. A presença de flavonóides na partição hexano pode ser explicada pela presença de agliconas livres com alto grau de metoxilação (SIMÕES et al., 1999).

Nos últimos anos, o interesse pelas propriedades farmacológicas e bioquímicas destes compostos tem crescido bastante, principalmente pela atividade antiinflamatória que apresentam. Tem-se estudado suas propriedades antioxidantes, tais como sua ação inibitória de enzimas, sua capacidade de quelar metais, como o ferro, e sua atuação como seqüestrante de radicais de oxigênio, uma vez que a presença destes radicais tem sido relacionada a certas doenças crônicas, como doenças auto-imunes (artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, entre outros), câncer, doença de Parkinson etc (CHUNG et al., 1998).

Alcalóides foram encontrados nas partições hexano e CH₂Cl₂, o que indica que possuem de baixa a média polaridade. Estudos anteriores revelaram que os alcalóides indólicos, indólicos monoterpênicos e benzilisoquinolínicos, característicos

da família Rubiaceae, também foram extraídos com solventes de baixa e média polaridade (OKUNADE et al., 1999; SOUZA et al., 2004).

Terpenos, em geral, são substâncias que possuem de baixa a média polaridade. A presença desses constituintes em solventes polares como *n*-BuOH pode ser explicada pela formação de saponinas triterpênicas.

Atividade antioxidante

Os métodos mais comumente utilizados para avaliação da atividade antioxidante por serem fáceis, rápidos e sensíveis são aqueles que envolvem compostos cromogênicos de um radical que simula as espécies reativas de oxigênio (EROs). A presença do antioxidante leva ao desaparecimento desses radicais cromogênicos. Um exemplo é o DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), um cromóforo extremamente estável que apresenta um pico de absorção no comprimento de onda de 515 nm em solução metanólica, pois possui uma coloração violeta intensa (ARNAO, 2000). Conforme o DPPH vai sendo reduzido por um antioxidante, seu elétron se torna emparelhado e a absorvidade desaparece (BRAND, CUVÉLIER e BERSET, 1995). Outro método que avalia a atividade antioxidante é a determinação do poder de redução, que indica a capacidade de um composto de doar elétrons, e conseqüentemente, de reduzir os intermediários oxidados por processos de peroxidação lipídica (OYAZU, 1986).

A atividade antioxidante apresentada pelo extrato e partições de *M. frigidus* não pode ser atribuída somente a um composto ou a uma simples classe de compostos. Os flavonóides e seus glicosídeos são conhecidos por possuírem atividade antioxidante (OSAWA, 1994). Propriedades antioxidantes também já foram relatadas para antraquinonas. (ALI et al., 2000; YEN, DUH e CHANG, 2000). Dessa forma, a presença desses compostos certamente está contribuindo para a atividade antioxidante dessa espécie.

Assim, os teores de compostos fenólicos e flavonóides foram determinados e relacionados com a atividade antioxidante. As partições AcOEt e *n*-BuOH apresentaram as maiores quantidades de fenóis totais e de flavonóides (515 e 240 mg/g e 423 e 145 mg/g, respectivamente). Estas partições também apresentaram maiores valores de CI_{50} quando se utilizou o radical DPPH (CI_{50} 7,0 e 9,0 μ g/ml, respectivamente). E, conseqüentemente, maiores porcentagens de inibição da

oxidação do radical DPPH (Figura 5). Uma correlação positiva entre teores de fenólicos e atividade seqüestrante do DPPH também foi observada. As partições AcOEt e *n*-BuOH apresentaram menor fator de correlação r^2 (0,8016 e 0,8614, respectivamente) devido aos altos índices de inibição do radical oxidante (Figura 7), visto a pronunciada atividade antioxidante das amostras nas menores concentrações avaliadas. Os valores do CI_{50} encontrados para essas partições foram menores que o encontrado para o flavonóide rutina (CI_{50} 13,0 $\mu\text{g/ml}$), indicando a significativa atividade antioxidante dessas amostras.

A capacidade redutora foi investigada com base na transformação do $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$, de acordo com o método de Oyaizu (1986). A habilidade redutora de um composto também é utilizada como indicativo para avaliação do seu potencial antioxidante. As partições AcOEt e *n*-BuOH apresentaram uma boa capacidade redutora, com CE_{50} de 35,0 e 41,0 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. O controle ácido ascórbico apresentou um CE_{50} de 25,0 $\mu\text{g/ml}$. Estas partições apresentaram maiores absorvâncias em 700 nm, as quais são proporcionais à capacidade redutora (Figura 6). Uma correlação positiva entre teores de fenólicos e a habilidade redutora também foi observada (Figura 8).

Com base nos resultados encontrados (Tabela 3), conclui-se que as amostras testadas, principalmente as partições AcOEt e *n*-BuOH possuem substâncias doadoras de elétrons e hidrogênio, capazes de neutralizar radicais livres. Este efeito converte os radicais livres em produtos mais estáveis. Eles também podem reduzir intermediários oxidativos dos processos de peroxidação lipídica, portanto podem agir como antioxidantes primários e secundários (YEN e CHEN, 1995).

Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de *M. frigidus* pelo método de difusão em ágar mostrou que o extrato bruto e a partição em CH_2Cl_2 foram ativos para todas as cepas de microrganismos testadas. O maior halo de inibição foi encontrado para o extrato bruto frente ao *B. cereus* (24 mm). Essa metodologia foi utilizada para se identificar às amostras que possuíam atividade antimicrobiana. Como não existe necessariamente uma correlação entre tamanho do halo de inibição e potencial antimicrobiano, as amostras que apresentaram halo de inibição tiveram as CIM determinadas. A não correlação entre os valores de CIM e

as zonas de inibição pode ser devido à maior ou menor difusibilidade dos componentes ativos no ágar. Segundo Rios e Recio (2005), extratos vegetais com CIM inferiores a 0,100 mg/ml são extremamente promissores. Assim, o extrato bruto apresentou atividade significativa para *B. cereus* com CIM = 0,078 mg/ml. A partição CH_2Cl_2 também apresentou excelente atividade antimicrobiana com CIM abaixo de 0,100 mg/ml para *S. sonnei*, *B. cereus*, *E. cloacae* e *C. neoformans* (CIM de 0,039; 0,020; 0,039 e 0,010 mg/ml, respectivamente), seguida das partições em hexano e AcOEt com CIM de 0,078 mg/ml para *S. pyogenes* e *C. neoformans*. Além desses parâmetros, a atividade total (ml/g), o percentual de atividade (%) e o índice de susceptibilidade microbiana, ISM, foram avaliados. Os resultados de atividade total confirmaram a eficácia do extrato bruto para *B. cereus* que apresentou atividade total de 1282 ml/g, seguido da partição CH_2Cl_2 com 500 ml/g. A partição CH_2Cl_2 foi a mais potente para *C. neoformans* com atividade total de 1000 ml/g. É interessante observar que o extrato bruto não apresentou atividade significativa para *C. neoformans*.

O percentual de atividade é um parâmetro que fornece o espectro de atividade das amostras. O extrato bruto e a partição CH_2Cl_2 apresentaram atividade para todos os microrganismos testados, mesmo que para alguns essa atividade não tenha sido significativa (Figura 9), o que sugere que os componentes mais ativos possuem média polaridade.

Já o ISM, que indica o grau de sensibilidade dos microrganismos frente às amostras, mostrou que *C. neoformans* e as bactérias Gram-negativas, de maneira geral foram mais susceptíveis. *S. aureus* foi a mais resistente (Figura 10). Porém, esses parâmetros quando calculados para as amostras que apresentaram CIM inferiores a 0,100 mg/ml indicaram que bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram igualmente susceptíveis sendo que a mais susceptível foi *B. cereus*, uma bactéria Gram-positiva (CIM 0,020 mg/ml) (Figura 11).

Devido à interessante atividade antimicrobiana encontrada na partição CH_2Cl_2 , ela foi fracionada em coluna de sílica e forneceu 20 frações. Pôde-se observar que a atividade antimicrobiana se concentrou na fração semi-pura F_6 que apresentou CIM $\leq 0,01$ mg/ml para 56% dos microrganismos testados. *S. thyphimurium*, *P. aeruginosa* e *C. neoformans* foram os mais susceptíveis com CIM = 0,005 mg/ml (Tabela 10). É importante ressaltar que para *P. aeruginosa*, o CIM encontrado para essa fração foi menor que o CIM observado para o controle cloranfenicol (CIM =

0,0156 mg/ml). As frações F₅ e F_{7L} também foram ativas para *C. neoformans* (CIM = 0,01 e 0,02 mg/ml, respectivamente).

O percentual de atividade antimicrobiana foi maior para as frações F₆ e F_{7L} com valores de 88,9% e 77,8%, respectivamente, seguido das frações F₅ e F₉ com 33,3% e as frações F₃ e F₁₂ com 22,2% (Figura 14). Já o ISM revelou que a cepa de *C. neoformans* foi susceptível a 50,0% das frações testadas, seguida das cepas de *B. cereus* (36,8%), *C. albicans* (18,8%), *E. coli* (15,8%) e *P. aeruginosa* (15,8%) (Figura 15).

A atividade total confirmou a maior atividade antimicrobiana de F₆. Esta fração apresentou para *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* e *C. neoformans*, uma atividade total de 22,0 ml/g.

Estudos anteriores mostraram que substâncias com atividade antibacteriana provenientes de plantas parecem ser mais ativas para organismos Gram-positivos do que para Gram-negativos (HERRERA et al., 1996). A razão dessa diferença de sensibilidade pode ser atribuída às características morfológicas entre estes microrganismos. Bactérias Gram-negativas possuem uma camada externa fosfolipídica com componentes estruturais de lipopolissacarídeos. As bactérias Gram-positivas devem ser mais susceptíveis a ação de substâncias por possuírem apenas uma camada externa de peptidoglicano como barreira efetiva (SCHERRER e GERARDT, 1971).

Antibióticos com atividade para bactérias Gram-negativas possuem mecanismo de ação diferentes. Os da classe aminoglicosídeos penetram na parede celular e na membrana, ligando aos ribossomos 30S, levando ao erro na leitura de RNAm provocando a morte da bactéria (TRABULSI et al., 1999). Já os beta-lactâmicos agem inibindo a síntese celular das bactérias. Essa interferência leva a formação de uma parede defeituosa, com instabilidade de permeabilidade. A morte da bactéria por lise, a qual parece ser mediada por autolisinas bacterianas como, hidrolases de peptidoglicano (CHAMBER, 2005).

O fato da fração semipurificada F₆ possuir maior espectro de ação contra as bactérias Gram-negativas pode ser atribuído à presença de substâncias lipofílicas que estejam agindo na membrana. A CCD dessa fração mostrou a presença de triterpeno, esteróide, antraquinona, alcalóide e flavonóide.

Tem sido demonstrado que os terpenos são ativos contra diversos microrganismos. Seu mecanismo de ação não está completamente elucidado,

porém acredita-se que envolve a ruptura da membrana celular por compostos lipofílicos. Esses resultados são extremamente importantes visto que bactérias Gram-negativas como *S. typhimurium* e *P. aeruginosa* são responsáveis por uma grande incidência de infecções. As infecções mais frequentes em UTIs são aquelas causadas por bacilos Gram-negativos, como *P. aeruginosa*, em especial pneumonias associadas à ventilação mecânica. No Brasil, a resistência a *P. aeruginosa* é muito preocupante. Nas UTIs dos grandes hospitais, resistência a *P. aeruginosa* é de 20 a 75% para antibióticos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos e isso vem acompanhado de resistência cruzada (ARRUDA, 1998). Infecções com *Salmonella* causam diarreias, febre, dores abdominais e normalmente as pessoas recuperam sem tratamento. No entanto, algumas pessoas como idosos, crianças e aqueles com sistema imune comprometido, a diarreia pode ser tão grave que o doente precisa ser hospitalizado. Nesses pacientes, a infecção pode se espalhar do intestino para a corrente sanguínea e, em seguida, para outros locais do corpo, podendo levar a morte (HOHMANN, 2001).

As frações com atividade anti-*Cryptococcus*, com CIM inferior a 0,025 mg/ml e anti-*Candida*, com CIM inferior a 0,100 mg/ml foram submetidas à bioautografia com o objetivo de se identificar a classe química das substâncias ativas.

Os resultados indicam que triterpenos e alcalóides exerceram inibição do crescimento fúngico (Figura 16). A fração F₆ apresentou três zonas de inibição do crescimento de *C. neoformans*, sendo duas possuindo substâncias da classe triterpênica (Rf = 0,75 e 0,63) e outra alcaloídica (Rf = 0,88). As substâncias com Rf = 0,75 e 0,88 presentes em F₆ também inibiram o crescimento de *C. albicans*, porém com menor intensidade confirmando assim os valores de CIM obtidos para essas frações. Na fração F₆ não foi observada inibição do crescimento de *C. albicans* pelas substâncias presentes na banda com Rf = 0,63. Esse fato pode ter ocorrido pela baixa concentração dessa substância nessa fração, visto que a bioautografia da partição CH₂Cl₂ apresenta essa banda ativa. A fração F_{7L} apresentou somente uma zona de inibição do crescimento dessas leveduras em uma banda contendo triterpenos com Rf = 0,75. A fração F₅, mesmo apresentando uma boa atividade antifúngica para ambas as leveduras (Tabela 10), não apresentou zonas de inibição de crescimento. Isto pode ser devido à baixa concentração da(s) substância(s) ativa(s) na amostra.

De acordo com os perfis cromatográficos apresentados por CLAE, pôde-se observar que as frações F_5 e F_6 apresentaram um mesmo pico majoritário com tempo de retenção de 16,6 min. Na fração F_{7L} foi observado outro pico com tempo de retenção de 12,6 min. Para confirmar se esses picos podem corresponder às substâncias com atividade antifúngica observadas na bioautografia, foi feita uma CCD das amostras de F_5 , F_6 e F_{7L} que foram analisadas por CLAE (Figura 16). Observou-se que a banda correspondente aos alcalóides com $R_f = 0,88$ também estava presente nas amostras F_5 e F_6 submetidas à análise por CLAE. Como o alcalóide presente nessa banda é mais apolar que os triterpenos presentes, sugere-se que ele corresponda à substância com tempo de retenção de 16,6 min. Triterpenos com $R_f = 0,75$ foram identificados somente em F_6 e F_{7L} sugerindo que ele seja correspondente à substância que apresentou tempo de retenção de 12,6 min. O triterpeno ativo com $R_f = 0,63$ não foi identificado por CLAE. Essas substâncias serão posteriormente isoladas e identificadas.

Já foi descrito que os terpenos apresentam atividade antimicrobiana por possuírem um grau de lipofilicidade que determina a toxicidade por interações com os constituintes da membrana desses organismos e seus arranjos (TOMAS-BARBERAN et al., 1990). Para alguns alcalóides com atividade antimicrobiana seu modo de ação tem sido atribuído à sua habilidade de intercalar com o DNA (PHILLIPSON e O'NEIL, 1989).

Estes resultados são de grande importância visto que estes fungos, nos últimos anos, têm recebido grande atenção de cientistas por serem patógenos que afetam pacientes imunologicamente comprometidos, como aqueles com a síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) (DROMEN, MATHOULIN e DUPONT, 1996). *C. albicans* pode causar infecções locais e/ou sistêmicas (ZHANG et al., 2002), sendo a candidíase oral a infecção oportunista mais comum nesses pacientes (FAN-HAVAND et al., 1991). Já *C. neoformans* pode causar meningite criptocócica, que é a infecção mais comum de criptococose, e é geralmente crônica e fatal se não tratada a tempo (COLLAZOS, 2003).

Estudos sobre SIDA mostraram que 58-81% de todos os pacientes contraem infecção fúngica em algum período durante o estágio primordial ou depois do desenvolvimento da SIDA e 10-20% morrem como consequência direta de infecções fúngicas (DROUHENT e DUPONT, 1989).

Atividade Leishmanicida

Foi realizada a avaliação da atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* do extrato bruto, partições e frações obtidas da partição em CH₂Cl₂. É interessante observar que, apesar do extrato bruto não ter apresentado atividade contra as formas promastigotas de *L. chagasi*, as partições em hexano e CH₂Cl₂ foram significativamente ativas para esse parasito (Cl₅₀ de 15,0 e 7,0 µg/ml, respectivamente). Esse fato pode ser devido às pequenas concentrações das substâncias leishmanicidas presentes no extrato bruto e que foram extraídas em hexano e CH₂Cl₂, sugerindo que essas substâncias possuam de média a baixa polaridade.

Para *L. amazonensis*, todas as amostras apresentaram atividade, exceto a partição *n*-BuOH, destacando-se as partições hidrometanólica e CH₂Cl₂ que tiveram Cl₅₀ de 9,0 e 11,0 µg/ml, respectivamente. Provavelmente as atividades observadas para essas partições de polaridades tão diferentes foram devido à presença de substâncias diferentes.

Dentre as frações obtidas da partição em CH₂Cl₂, a atividade leishmanicida se concentrou nas frações de F₅ a F₁₅, eluídas com CHCl₃:AcOEt em proporções diferentes (Tabela 8). As mais ativas para ambas as espécies de *Leishmania* foram F₆ e F_{7L}. A fração F₅ foi ativa somente para *L. chagasi* enquanto as frações mais polares, F₁₂ a F₁₅, foram específicas para *L. amazonensis*. Apesar da atividade ter sido mais significativa para F₆ e F_{7L}, é mais interessante buscar a(s) substância(s) ativa(s) nas frações de F₁₀ a F₁₅, pois essas possuem maior especificidade para espécies de *Leishmania*, visto que não apresentaram atividade antimicrobiana significativa. Flavonóides foram observados em todas as frações ativas, sendo glicosídeos flavônicos presentes nas frações de F₁₂ a F₁₆ (Tabela 12). Estudos recentes (SEN et al., 2005) revelaram que os flavonóides podem agir inibindo a síntese de DNA e paralisando a progressão do ciclo celular desses parasitos, conduzindo à apoptose (MITRA et al., 2000). Além disso, já foi relatada a eficácia de flavonóides em controlar o desenvolvimento de anemia durante o período pós-infecção com leishmaniose visceral (SEN et al., 2005).

Tasdemir et al. (2006) relatou que o aumento de hidroxilações na estruturas de flavonóides aumenta sua atividade leishmanicida. Além disso, o aumento de substituições dos grupos hidroxilas por metoxilação diminui sua atividade.

Atividade Citotóxica

Atividade citotóxica foi observada para o extrato bruto de *M. frigidus* e para as partições hexânica e CH₂Cl₂ (CL₅₀ 127, 61 e 111 µg/ml, respectivamente). Citotoxicidade significativa frente à *Artemia salina* (CL₅₀ ≤ 20 µg/ml) foi observada para as frações F₂, F₃, F₅, F₆, F₇. Como existe forte correlação entre citotoxicidade frente a esse microcrustáceo e atividade antitumoral, essas amostras são candidatas a futuros ensaios com células tumorais.

5.2 EXTRAÇÃO DE ALCALÓIDES E FRACIONAMENTO DE ppt_{MeOH}

A família Rubiaceae é rica em alcalóides indólicos e benzilisoquinolínicos para os quais já foram descritas inúmeras atividades biológicas. Isso torna interessante o isolamento dos alcalóides de *M. frigidus*, pois existe uma grande possibilidade de serem encontrados alcalóides altamente bioativos (PRAKASH et al., 1999).

Dessa forma os alcalóides foram extraídos das partes aéreas de *M. frigidus* e suas atividades antimicrobiana, citotóxica e leishmanicida avaliadas. O ppt_{MeOH} apresentou atividade antimicrobiana (Tabela 14) e foi então fracionado em coluna de Sephadex LH 20. Não se pode atribuir a atividade antimicrobiana encontrada nas frações (Tabela 14) somente a presença de alcalóides visto que não só a fração F_{2A}, ricas em alcalóides, apresentou propriedade antimicrobiana. A atividade antibacteriana presente nas frações não foi observada no ppt_{MeOH}, provavelmente devido às baixas concentrações das substâncias ativas presentes nessa amostra.

Em relação às frações de ppt_{MeOH}, a F_{2A} foi a que apresentou maior atividade total, 12,70 ml/g, para *B. cereus*, *P. aeruginosa* e *C. neoformans*. Já o percentual de atividade indicou que F_{1A} apresentou maior espectro de ação, porém essa fração não apresenta alcalóides na sua constituição.

O ISM mostrou que os microrganismos *B. cereus*, *P. aeruginosa* e *C. neoformans*, foram os mais susceptíveis.

Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE para ppt_{MeOH}, F_{2A} (Figura 21) são semelhantes, indicando que possuem os mesmos constituintes, porém em concentrações diferentes. Comparando-se esses perfis cromatográficos com os das

frações F₅ e F₆, provenientes do fracionamento da partição CH₂Cl₂, observou-se que F_{2A} não possui as mesmas substâncias com atividade antifúngica identificadas em F₅ e F₆. Os alcalóides presentes em F_{2A} são mais polares que o alcalóide presente em F₅ e F₆ e, dessa forma, devem possuir um modo de ação diferente.

5.3 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *M. frigidus*

O óleo essencial de *M. frigidus* foi analisado por CG/EM. Dentre as substâncias identificadas no óleo, o linalol e o acetato de eugenol foram os majoritários.

Linalol é um monoterpeno prevalente nos óleos essenciais de várias espécies de plantas aromáticas. É amplamente usado como fixador de fragrância na indústria cosmética mundial (FENNER et al., 2006). Estudos farmacológicos revelaram os efeitos analgésicos do linalol, bem como seu possível mecanismo de ação no organismo. Ele induziu a redução da liberação de acetilcolina, ligada a alguma interação com a função pré-sináptica. Tais estudos fornecem assim uma base racional para o consagrado uso de plantas que o possuem em sua composição (manjerição e bergamota, entre outras). Outra propriedade atribuída recentemente ao linalol foi à capacidade de inibir o desenvolvimento de larvas do mosquito da dengue *Aedes aegypt*. As águas residuais de extração deste óleo são, assim, uma alternativa ao uso de inseticidas sintéticos na prevenção desta doença epidêmica (GOTTLIEB et al., 1981).

O acetato de eugenol é derivado do óleo volátil eugenol que é uma substância aromática, empregada como agente antibacteriana, antimicótica, antiinflamatória, anestésica, anti-séptica, antioxidante, alelopática, repelente, e em cosméticos, perfumes e condimentos (COSTA, 1994; LAHLOU, 2004).

Não há relato do modo de ação dos constituintes presentes no óleo de *M. frigidus*. Normalmente a atividade não é atribuída a um constituinte, mas sim ao óleo como todo.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. frigidus* foi avaliada e pode-se observar uma moderada atividade antibacteriana, sendo os resultados mais expressivos encontrados para *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* e *E. cloacae*, com CIM de 0,250 mg/ml. Também apresentou uma excelente atividade antifúngica, com

CIM abaixo de 0,1 mg/ml para *C. albicans* – CIM 0,063 mg/ml e *C. neoformans* – CIM 0,008 mg/ml.

Óleos essenciais de muitas plantas medicinais possuem atividade antifúngica, mas o mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido (KALEMBA e KUNICKA, 2003).

De acordo com Cowan (1999), a lipofilia dos constituintes de óleos essenciais explicaria sua atividade antimicrobiana, característica que permite a partição desses compostos nos lipídeos da membrana celular e da mitocôndria, aumentando sua permeabilidade e levando ao extravasamento do conteúdo celular. Segundo outros autores, componentes dos óleos essenciais também podem agir sobre proteínas celulares localizadas nas membranas citoplasmáticas, entre elas as ATPases, através de sua acumulação na dupla camada lipídica e conseqüente destruição da interação lipídeo-proteína. Alternativamente, é possível uma interação direta de compostos lipofílicos com porções hidrofóbicas das proteínas (JUVEN et al., 1994; SIKKEMA, DE BONT e POOLMAN, 1995). Entretanto, devido ao grande número de diferentes grupos químicos presente nos óleos essenciais, é provável que sua atividade antimicrobiana não esteja relacionada a um mecanismo de ação específico (SKANDAMIS e NYCHAS, 2001; CARSON, MEE e RILEY, 2002).

Através de CCD (Figura 24) foi possível verificar que os constituintes ativos do óleo não são os mesmos das frações F₆ e F_{7L}, visto que os do óleo são mais polares que os encontrados nas frações.

O óleo essencial também foi analisado contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* e não apresentou resultado significativo, com CI₅₀ > 250,0 µg/ml para ambas.

Quanto à atividade antioxidante frente ao DPPH, o óleo apresentou CI₅₀ 38,0 µg/ml. Essa atividade possivelmente foi proveniente de compostos aromáticos como salicilato de metila.

O teste de letalidade contra *Artemia salina* revelou uma moderada citotoxicidade do óleo de *M. frigidus* com CL₅₀ 88,0 µg/ml.

6 CONCLUSÕES

M. frigidus se apresenta como uma fonte promissora de substâncias que possuem atividades biológicas importantes como antioxidante, antimicrobiana, leishmanicida e citotóxica.

Estudo fitoquímico preliminar mostrou que essa espécie possui alcalóides, triterpenos, esteróides, saponinas, taninos, antraquinonas, leucoantocianidinas, catequinas e flavonóides.

Todas as partições apresentaram atividade para um determinado modelo biológico avaliado:

-A partição hexânica foi a mais ativa no teste de letalidade frente à *Artemia salina* ($CL_{50} = 61,0 \mu\text{g/ml}$);

-A partição CH_2Cl_2 apresentou atividades antimicrobiana e leishmanicida significativas (CIM = 0,039; 0,039; 0,020; 0,010 mg/ml para *S. sonnei*, *B. cereus*, *E. cloacae* e *C. neoformans*, respectivamente. E $Cl_{50} = 11,0$ e $7,0 \mu\text{g/ml}$ para *L. amazonensis* e *L. chagasi*, respectivamente);

-As partições AcOEt e *n*-BuOH apresentaram atividade antioxidante frente ao DPPH ($Cl_{50} = 7,0$ e $9,0 \mu\text{g/ml}$, respectivamente) inferior ao padrão rutina. Observou-se uma correlação positiva dessa atividade com o conteúdo de compostos fenólicos e de flavonóides;

-A partição hidrometanólica foi significativamente ativa para formas promastigostas de *L. amazonensis* ($Cl_{50} = 9,0 \mu\text{g/ml}$).

O fracionamento da partição CH_2Cl_2 forneceu frações semi-purificadas que apresentaram atividades citotóxica (F_2 , F_3 , F_5 , F_6 , F_7 com $CL_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$), antimicrobiana (F_5 com CIM = 0,010 mg/ml para *C. neoformans*; F_6 com CIM = 0,005; 0,010; 0,010; 0,005; 0,020; 0,005 para *S. typhimurium*, *S. sonnei*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *C. neoformans*, respectivamente e F_{7L} com CIM = 0,020 mg/ml para *C. neoformans*) e leishmanicida (F_6 a F_{16} com $Cl_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ para *L. amazonensis* e F_5 a F_{11} com $Cl_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ para *L. chagasi*) significativas.

As frações mais polares ricas em glicosídeos flavônicos apresentaram atividade específica para *L. amazonensis* (F_{12} a F_{16} com $Cl_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$).

A bioautografia identificou triterpenos e alcalóides como às classes de substâncias ativas para *C. neoformans* e *C. albicans*

Os picos observados em CLAE com TR = 12,6 e 16,6 min correspondem às substâncias triterpênica e alcaloídica com atividade antifúngica.

Os alcalóides isolados apresentaram atividade moderada para *C. neoformans* (CIM = 0,078 mg/ml)

O óleo essencial apresentou linalol e acetato de eugenol como constituintes majoritários e significativa atividade antifúngica, principalmente *anti-Cryptococcus* (CIM = 0,008 mg/ml)

Os resultados apresentados abrem perspectivas para o futuro isolamento, purificação e identificação das substâncias bioativas de *Mitracarpus frigidus* que possam ser utilizadas no tratamento de infecções microbianas e leishmanioses.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHENBACH, H.; LOTTES, M.; WAIBEL, R.; KARIKAS, G.A.; CORREA, M.D.; GUPTA, M.P. 1995. Constituents of tropical medicinal plants. 66. Alkaloids and other compounds from *Psychotria correae*. **Phytochemistry**, **38 (6)**: 1537-1545.

AFONSO-NETO, I.S. 2003. **Atividade moluscicida e repelente de três espécies de *Euphorbia* (Euphorbiaceae) sobre *Leptinaria unilamellata* d'Orbygni (Gastropoda: Subulinidae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, 54 p.

AHMAD, I.; BEG, A.Z. 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, **74**: 113-123.

AHMAD, I., MEHMOOD, Z., MOHAMMAD, F. 1998. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. **Journal of Ethnopharmacology**, **62**: 183-193.

ALI, A.M.; ISMAIL, N.H.; MACKEEN, M.M.; YAZAN, L.S.; MOHAMED, S.M.; HO, A.S.H.; LAJIS N.H. 2000. Antiviral, cytotoxic and antimicrobial activities of anthraquinones isolated from the roots of *Morinda elliptica*. **Pharmaceutical Biology**, **38 (4)**: 298-301.

ARAÚJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; LEON, L.L. 1998. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Cebtrobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**, **49**: 751-754.

ARAÚJO, C.A.C.; LEON, L.L. 2001. Biological activities of *Curcuma long* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **96 (5)**: 723-728.

ARNAO, M.B. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, **11**: 419-421.

ARRUDA, E.A.G. 1998. Infecção hospitalar por *P. aeruginosa* multi-resistente: análise epidemiológica HC-FMUSP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **31 (5)**: 503-504.

ARUOMA, O.I. 1997. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American oil Chemists' Society**, **32**: 671-683.

AUSTIN, D.J.; KRISTINSSON, K.G.; ANDERSON, R.M. 1999. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. **Proceeding of National Academy of Science-USA**, **96**: 1152-1156.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, F.; LIMA, H.C. 1991. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 3 ed. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa.

BASER, K.H.C.; OZEK, T.; KIRIMER, N.; DELIORMAN, D.; ERGUN, F. 2004. Composition of the essential oils of *Gallium aparine* L. and *Gallium odoratum* (L.) Scop. from Turkey. **Journal of Essential Oil Research**, **16**: 305-307.

BENENSON, A.S. 1995. **Control of Communicable Diseases Manual**. American Public Health Association. 16th Edition, p. 421-425.

BISIGNANO, G.; SANOGO, R.; MARINO, A.; AQUINO, R.; D'ANGELO, V.; GERMANO, M.P.; De PASQUALE, R.; PIZZA, C. 2000. Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. **Letters In Applied Microbiology**, **30 (2)**: 105-108.

BONJAR, G.H.S. 2004. New approaches in screening for antibacterials in plants. **Asian Journal of Plant Science**, **3**: 55-60.

BORG, D.C. 1993. Oxygen free radicals and tissue injury. In: Tarr, M and Sanson, F. Editors. **Oxygen free radicals in tissue damage**. Birkhauser, Boston, MA, p. 12-55.

BORRIS, R.P. 1996. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal of Ethnopharmacology**, **51**: 29-38.

BRAND, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology, London**, **28(1)**: 25-30.

CAMACHO, M.R.; PHILLIPSON, J.D.; CROFT, L.S.; KIRBY, G.C.; WARHURST, D.C.; SOLIS, P.N. 2000. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. **Phytochemistry**, **56**: 203-210.

CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **46**: 1914-1920.

CHABOT, S.; BEL-RHILD, R.; CHENEVERT, R.; PICHE, Y. 1992. Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus. *Gigaspora margarita* Becker and Hall, by the activity of structurally specific flavonóide compounds under CO₂-enriched conditions. **New Phytologist**, **122**: 461-467.

CHAMBERS, H.F. 2005. **Antibióticos beta-lactâmicos e outros inibidores da síntese da parede celular**. In: Katzung, B.G. Farmacologia Básica e Clínica. 9^o Edição. Guanabara Koogan: RJ, cap. 43, 614-29p.

CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; PEREZ, A.M.; BELLEVILLE, M.P.; ZUNIGA, C.; BRAT, P. 2007. The ripening and aging of noni fruits (*Morinda citrifolia* L.): microbiological flora and antioxidant compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **87 (9)**: 1710-1716.

CHEN, M.; CHRISTENSEN, S.B.; BLOM, J.; LEMMICH, E.; NADELMANN, L.; FICH, K.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. 1993. Liochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **37**: 2550-2556.

CHEVOLLEAU, S.; MALLET, J.F.; UCCIANI, E.; GAMISANS, J.; GRUBER, M. 1992. Antioxidant activity in leaves of some Mediterranean plants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, **69**: 1269-1271.

CHUNG, K.T.; WONG, T.Y.; HUANG, Y.W.; LIN, Y. 1998. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, **38**: 421-464.

COLLAZOS, J. 2003. Opportunistic infections of the CNS in patients with AIDS: diagnosis and management. **CNS Drugs**, **17**: 869-887.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. 1997. **Introdução a métodos cromatográficos**. UNICAMP, 7^a ed., São Paulo, p.65, 68,185.

CORDELL, G. A. 1995. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, **40**: 1585-1612.

CORDELL, G.A.; QUINN-BEATTIE, M.L.; FARNSWORTH, N.R. 2001. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, **15**: 183-205.

COSTA, A.F. 1978. **Farmacognosia**. 2 ed., V. II. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

COSTA, A.F. 1994. **Farmacognosia**. 5 ed. Lisboa: Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, p. 1031.

COUTINHO, M.R.; QUADRI, M.B.; MOREIRA, R.F.P.M.; QUADRI, M.G.N. 2004. Partial purification of anthocyanins from *Brassica oleracea* (red cabbage). **Separation Science and Technology**, **39(16)**: 3769-3782.

COWAN, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, **12**: 546-582.

DALZIER, J.M. 1936. **Useful Plants of West tropical Africa**. London: The Crown Agents for Overseas Colonies.

DAUD, A.; GALLO, A.; RIERA, A.S. 2005. Antimicrobial properties of *Phrygilanthus acutifolius*. **Journal of Ethnopharmacology**, **99(2)**: 193-197.

DESJEUX, P. 1996. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, **14**: 417-423.

DEWICH, P.M. 2002. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, Ltd. 2^o Ed. 291-375p.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; MAJUMBER, S.; ARIMA, S.; SATO, N.; HARIGAYA, Y. 2006. A new bis-iridoid glucoside from *Mussaenda incana*. **Chinese Chemical Letters**, **17 (10)**: 1331-1334.

DIXON, R.A.; DEY, P.M.; LAMB, C.J. 1983. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, **55**: 1-69.

DROMER, F.; MATHOULIN, S.; DUPONT, B. 1996. Comparison of the efficacy of amphotericin B and fluconazole in the treatment of cryptococcosis in human

immunodeficiency virus-negative patients: retrospective analysis of 83 cases. **Clinical Infectious Diseases**, **22**: 154-160.

DROUHENT, E.; DUPONT, B. 1989. Fluconazole for the treatment of fungal diseases in immunosuppressed patients. **Annals New York Academy of Science**, **544**: 546-570.

DUH, P.-D.; YEN, G.-C. 1997. Antioxidative activity of three water extracts. **Food Chemistry**, **60**: 639-645.

ELOFF, J.N. 2004. Quantifying the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay-guided fractionation. **Phytomedicine**, **11**: 370-371.

FAN-HAVARD, P.; CAPANO, D.; SMITH, S.M.; MANGIA, A.; ENG, R.H.K. 1991. Development of resistance in *Candida* isolates from patients receiving prolonged antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **35**: 2302-2305.

FESSENDEN, R.J. 1983. **Organic chemistry**. Boston: Willard Grant Press.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. 2006. Plants with potential antifungal activity employed in Brazilian folk medicine. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, **42 (3)**: 369-394.

FINNEY, D.J. 1971. **Probit Analysis**. 3rd ed. University Press, Cambridge.

FOURNET, A.; BARRIOS, A.A.; MUNÓZ, V.; HOCQUEMILLER, C.A. 1992. Effects of natural naphthoquinones in Balb/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. **Tropical Medicine and Parasitology**, **43**: 219-222.

FREI, B. 1999. Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. **Faseb Journal**, **13(9)**: 963-964.

GARCIA-GRANADOS, A.; LINAN, E.; MARTINEZ, A.; RIVAS, F.; MESA-VALLE, C.; CASTILLA-CALVENTE, J.J.; OSUNA, A. 1997. *In vitro* action of ent-manoyl oxydes against *Leishmania donovani*. **Journal of Natural Products**, **60**: 13-16.

GBAGUIDI, F.; MUCCIOLI, G.; ACCROMBESSI, G.; MOUDACHIROU, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. 2005. Densitometric HPLC quantification of 2-azaanthraquinone

isolated from *Mitracarpus scaber* and antimicrobial activity against *Dermatophilus congolensis*. **Journal of Planar Chromatography-Modern TLC**, **18 (105)**: 377-379.

GBAGUIDI, F.; ACCROMBESSI, G.; MOUDACHIROU, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. 2005. HPLC quantification of two isomeric triterpenic acids isolated from *Mitracarpus scaber* and antimicrobial activity on *Dermatophilus congolensis*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, **39**: 990-995.

GEISSMAN, C.S. 1963. **Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds**, p. 265. In M. Florkin and E. H. Stotz (ed.), Pyrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents, vol. 9. Elsevier, New York, N. Y.

GEOGOPAPADAKOU, N.H.; WALSH, T.J. 1994. Human mycoses – drugs and targets for emerging pathogens. **Science**, **264(5157)**: 371-373.

GENARO, O.; de TOLEDO V.P.C.P.; da COSTA C.A.; HERMETO M.V.; AFONSO L.C.C.; MAYRINK, W. 1996. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy Brazil. **Clinics in Dermatology**, **14**: 503-512.

GERMANO, M.P.; SANOGO, R.; COSTA, C.; FULCO, R.; D'ANGELO, V.; TORRE, E.A.; VISCOMI, M.G.; De PASQUALE, R. 1999. Hepatoprotective properties of *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, **51**: 729-734.

GOTTLIEB, O.R.; KOKETSU, M.; MAGALHÃES, M.T.; MAIA, J.G.D.; MENDES, A.I.; DA SILVA, M.L.; WILBERG, V.C. 1981. Óleos essenciais da Amazônia. VII. **Acta Amazonica**, **11**: 143-148.

GOVIDARAJAN, R.; RASTOGI, S.; VIJAYAKUMAR, M.; SHIRWAIKAR, A.; RAWAT, A.K.S.; MEHROTRA, S.; PUSHPANGADAN, P. 2003. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, **26**: 1424-1427.

GRIMALDI, G.Jr.; TESH, R.B. 1993. Leishmaniases of the new-world - current concepts and implications for future-research. **Clinical Microbiology Reviews**, **6**: 230-250.

GUPTE, M., KULKARNI, P., GANGULI, B.N. 2002 Antifungal antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **58**: 46-57.

GUVEN, K., MUTLU, M.B., AVCI, O. 2005. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in meat and meat products consumed in Turkey. **Journal of Food Safety**, **26**: 30-40.

GUVENALP, Z.; KILIC, N.; KAZAZ, C.; KAYA, Y.; DEMIREZER, L.O. 2006. Chemical constituents of *Galium tortumense*. **Turkish Journal of Chemistry**, **30 (4)**: 515-523.

HALLIWELL, B. 1990. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical Research Communication**, **9 (1)**: 1-32.

HALLIWELL, B. 1994. Free radical and antioxidant a personal view. **Nutrition Reviews**, **52 (8)**: 253-261.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. 1985. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, Oxford, UK.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. 1989. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Sciences**, **15 (4)**: 129-135.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O.J. 1995. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, **33 (7)**: 601-617.

HAMMARTON, T.C.; MONTRAM, J.C.; DOERING, C. 2003. The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploration. **Program Cell Cycle Research**, **5**: 91-101.

HARVEY, A.L. 1999. Medicines form nature: are natural products still relevant to drug discovery. **Trends in Pharmacology Science**, **20**: 196-198.

HARVEY, A.L. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, **5**: 294-300.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, **13**: 572-584.

HERRERA, R.M.; PEREZ, M.; MARTIN-HERRERA, D.A.; LOPEZ-GARCIA, R.; RABANAL, R.M. 1996. Antimicrobial activity of extracts from plants endemics to the Canary Islands. **Phytotherapy Research**, **10**: 364-366.

HOHMANN, E.L. 2001. Nontyphoidal salmonellosis. **Clinical Infectious Diseases**, **32 (2)**: 263-269.

IROB, O.N.; DARAMOLA, S.O. 1993. Antifungal activities of crude extracts of *Mitracarpus-villosus* (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, **40**: 137-140.

IROB, O.N.; DARAMOLA, S.O. 1994. Bactericidal properties of crude extracts of *Mitracarpus-villosus*. **Journal of Ethnopharmacology**, **42** : 39-43.

ITOH, A.; TANAHASHI, T.; NAGAKURA, N.; NAYESHIRO, H. 1994. Tetrahydroisoquinoline-monoterpene glucosides from *Algagium lamarckii* and *Cephaelis ipecacuanha*. **Phytochemistry**, **36 (2)**: 383-387.

JAMIESON, D. 1989. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. **Free Radical Biology and Medicine**, **7 (1)**: 87-108.

JEDEGE I.A.; KUNLE O.F.; IBRAHIM, J.A.; UGBABE G.; OKOGUN, I.J. 2005. Pharmacognostic investigation of leaves of *Mitracarpus villosus* (SW). **African Journal of Biotechnology**, **4 (9)**: 957-959.

JONES, G.A.; MCALLISTER, T.A.; MUIR, A.D.; CHENG, K.J. 1994. Effects of sainfoin (*Onobrychis vivifolia* scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, **60**: 1374-1378.

JONES, R.N. 2001. Resistance patterns among nosocomial pathogens - Trends over the past few years. **CHEST**, **119**: 397-404.

JUANJUAN, D.; ZHIYONG, Z.; XIAOJU, L.; YALI, X.; XIBAI, Z.; ZHENZHEN, I. 2007. Retrospective analysis of bacteremia because of *Enterobacter cloacae* compared with *Escherichia coli* bacteremia. **International Journal of Clinical Practice**, **61 (4)**: 583-588.

JUDD, W.S.; CAPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F. 1999. **Plant systematics a phylogenetic approach**. Massachusetts, USA, Sinauer Associates, Inc.

JUVEN, B.J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, **76**: 626-631.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, **10**: 813-829.

KAM, T.S.; SIM, K.M.; KOYANA, T.; TOYOSHIMA, M.; HAYASH, M.; KOMIYAMA, K. 1997. Cytotoxic and leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. **Journal of Natural Products**, **61**: 1332-1336.

KAMIYA, K.; TANAKA, Y.; ENDANG, H.; UMAR, M.; SATAKE, T. 2005. New anthraquinone and Iridoid from the fruits *Morinda citrifolia*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **53 (12)**: 1597-1599.

KANCHANAPOOM, T.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. 2002. Iridoid and phenolic diglycosides from *Canthium berberidifolium*. **Phytochemistry**, **61 (4)**: 461-464.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON Jr, E. 1994. **Free Radicals Scavenging and Antioxidant Activity of Plant Flavonoids**. In: Armstrong, D. (Ed.) Free Radicals in Diagnostic Medicine, *Plenum Press*, New York, pp 351-376.

KERHARO, J.; ADAM, J.G. 1974. In **La Pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle: Plantas Médicinales Et Toxiques**. pp. 692-693. Paris: Editions Vigot Frères.

KINGHORN, A.D.; FARNSWORTH, N.R.; SOEJARTO, D.D.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J.M.; UDEANI, G.O.; WANI, M.C.; WALL, M.E.; NAVARRO, H.A.; KRAMER, R.A.; MENENDEZ, A.T.; FAIRCHILD, C.R.; LANE, K.E.; FORENZA, S.; VYAS, D.M.; LAM, K.S.; SHU, Y.Z. 1999. Novel strategies for the discovery of plant-derived anticancer agents. **Pure Applied Chemistry**, **71**: 1611-1618.

KITAGAWA, I.; WEI, H.; NAGAO, S.; MAHMUD, T.; HORI, K.; KOBAYASHI, M.; UJI, T.; SHIBUYA, H. 1996. Indonesian medicinal plants. 14. Characterization of 3'-O-caffeoylsweroside, a new secoiridoid glucoside, and kelampayaosides A and B, two new phenolic Apioglucosides, from the bark of *Anthocephalus chinensis* (Rubiaceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **44 (6)**: 1162-1167.

KUMAR, V.P.; CHAUHAN, N.S.; PADH, H. 2006. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, **107 (2)**: 182-188.

LAHLOU, M. 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. **Phytotherapy Research**, **18**: 435-444.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. 1992. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência e Cultura**, **44**: 94-105.

LENDL, A.; WERNER, I.; GLASI, S.; KLETTER, C.; MUCAJI, P.; PRESSER, A.; REZNICEK, G.; JURENITSCH, J.; TAULOR, D.W. 2005. Phenolic and terpenoid compounds from *Chione venosa* (sw.) URBAN var. *venosa* (Bois Bande). **Phytochemistry**, **66** (19): 2381-2387.

LENTZ, D.L.; CLARK, A.M.; HUFFORD, C.D.; MEURER-GRIMES, B.; PASSREITER, C.M.; CORDERO, J.; IBRAHIMI, O.; OKUNADE, A.L. 1998. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, **63** (3): 253-263.

LEON, L.L.; MACHADO, G.M.C.; CARVALHO-PAES, L.E.; GRIMALDI, J.G. 1990. Antigenic differences of *Leishmania amazonensis* isolates causing diffuse cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **84**: 678-680.

LIU, H.M.; FENG, X.Z. 1993. Oxindole alkaloids from *Uncaria sinensis*. **Phytochemistry**, **33** (3): 707-710.

M'BONGO, N.; LOISEAU, P.M.; LAWRENCE, F.; BORIES, C., CRACIUNESCU, D.G.; ROBERT-GERO, M. 1997. In vitro sensitivity of *Leishmania donovani* to organometallic derivatives of pentamidine. **Parasitology Research**, **83**: 515-517.

MACLAUGHLIN, J.M. 1991. **Crown gall tumours on potato discs and brine shrimps lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation**. In: Hostettmann, K (ed), *Methods in Biochemistry*, Vol. 6, Assays for Bioactivity. London, Academic Press, p 1-32.

MACLAUGHLIN, J.L., ROGERS, L.L. 2001. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, **32**: 513-524.

MARSDEN, P.D. 1985. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical do Estado de São Paulo**, **18**: 187-198.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANE, D.C.; DIAS, J.E. 2000. **Plantas Medicinais**. Viçosa: UFV. 220p.

MASON, T.L.; WASSERMAN, B.P. 1987. Inactivation of red beet betaglucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. **Phytochemistry**, **26**: 2197-2202.

MATOS, F.J.A. 1997. **Introdução à Fitoquímica Experimental**, EUFC, Fortaleza, Brazil.

MAVI, A.; TERZI, Z.; OZGEN, U.; YILDIRM, A.; COSKUN, M. 2004. Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulaceae* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, **27** (5): 702-705.

MENDONZA, L.; WILKENS, M.; URZUA, A. 1997. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, **58**: 85-88.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MACLAUGHLIN, J.L. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, **45**: 31-34.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN-BEEK, T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and plant extracts. **Food Chemistry**, **85**: 231-237.

MITTAL, N.; GUPTA, N.; SAKSENA, S.; GOYAL, N.; ROY, U.; RASTOGI, A.K. 1998. Protective effect of picrolive from *Pichrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. **Life Sciences**, **63**: 1823-1834.

MOSSMAN, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application for proliferation in cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, **65**: 55-63.

MOULIS, C.; PELISIER, J.; BAMBA, D.; FOURASTÉ, L. 1992. **Pentalongin, antifungal naphthoquinoid pigment from *Mitracarpus scaber***. Second International Congress on Ethnopharmacology, Uppsala, Sweden. Stockholm: The Swedish Academy of Pharmaceutical Sciences.

MS/FUNASA, 2005. **Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral**. In: Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil. Ministério da Saúde/ Fundação Nacional da Saúde, Brasília. 2ª edição. p27.

MS/Guia de Vigilância Epidemiológica, 1998. **Leishmaniose Tegumentar Americana –LTA**. In: Guia de Vigilância Epidemiológica, Fundação Nacional da Saúde, Brasília. 5ª edição.

MUKHERJEE, K.S.; MUKHPPADHYAY, B.; MONDAL, S.; GORAI, D.; BRAHMACHARI, G. 2004. Triterpenoid constituents of *Borreira articularis*. **Journal of Chinese Chemical Society**, **51 (1)**: 229-231.

NAMIKI, M. 1990. Antioxidant /antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, **29 (4)**: 273-300.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2002. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved standard M27-A2 - P. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2003. **Reference method for disk diffusion antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved standard M44 - P. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA.

NAVAE, M.N.; MIRZA, M.; DIN, M. 2006. Chemical composition of the essential oils of *Rubia tinctorium* L. **Flavour and Fragrance Journal**, **21 (3)**: 519-520.

NOK, A.J. 2002. Azaantraquinone inhibits respiration and in vitro growth of long slender bloodstream forms of *Trypanosoma congolense*. **Cell Biochemistry and Function**, **20**: 205-212.

O'KENNEDY, R.; THORNES, R.D. 1997. **Coumarins: biology, applications and mode of action**. New York: John Willey.

OKUNADE, A.L., CLARK, A.M., HUFFORD, C.D., OGUNTIMEIN, B.O. 1999. Azaantraquinone; An antimicrobial alkaloid from *Mitracarpus scaber*. **Planta Medica**, **65**: 447-448.

ONO, M.; UENO, M.; MASUOKA, C.; IKEDA, T.; NOHARA, T. 2005. Iridoid glucosides from the fruit of *Genipa americana*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **53 (10)**: 1342-1344.

OSAWA, T. 1994. **Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems**. In: URITANY, I.; GARCIA, V.V.; MENDONZA, E.M. (Eds.), Postharvest Biochemistry of Plant Food-Materials in the Tropics. Japan Scientific Society Press, Tokyo, 241-251.

OSKAY, M.; SARI, D. 2007. Antimicrobial screening of some Turkish medicinal plants. **Pharmaceutical Biology**, **45 (3)**: 176-181.

OYAZU, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. **Japanese Journal of Nutrition**, **44**: 307-315.

PACKER, L.; GLAZER, A.N. 1990. **Methods in enzymology: oxygen radicals and antioxidants** (v. 186, Part B). Academic Press, San Diego, CA.

PARRA, A.L.; YHEBRA, R.S.; SARDINAS, I.G.; BUELA, L.I. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimative of the medium lethal dose (LC₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, **8**: 395-400.

PASSOS, V.M.A. 1998. **Leishmaniose Tegumentar Americana: caracterização clínica, evolutiva, laboratorial e epidemiológica (Belo Horizonte, 1989-95)**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1998. 188p. (Tese, Doutorado em Medicina Tropical).

PEREIRA, Z.V.; CARVALHO-OKANO, R.M.; GARCIA, F.C.P. 2006. Rubiaceae Juss. da Reserva Florestal Mata de Paraíso, Viçosa, MG, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, **20 (10)**: 207-224.

PEREZ, C.; PAULI, M.; BAZERQUE, P. 1990. An antibiotic assay by the well agar method. **Acta Biologiae et Medicine Experimentalis**, **15**: 113-115.

PEREZ, H.; DÍAS, F.; MEDINA, J.D. 1998. Chemical investigation and *in vivo* antimalarial activity of *Tabebuia achraceae* ssp. *neochrysantha*. **International Journal of Pharmacognosy**, **35**: 227-231.

PHILLIPSON, J.D.; O'NEIL, M.J. 1989. New leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. **Acta Pharmaceutica Nordica**, **1**: 131-144.

PILARSKI, R.; ZIELINSKI, H.; CIESIOLKA, D.; GULEWICZ, K. 2006. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, **104** (1-2): 18-23.

PRAKASH, A.S.; PEREIRA, T.N.; REILLY, P.E.B.; SEAWRIGHT, A.A. 1999. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, **443**: 53-67.

PRATES, M.V.; BLOCH JÚNIOR, C. 2001. Peptídeos antimicrobianos. **Biotechnology**, **23**: 30-36.

QUEIROZ, E.F.; ROBLLOT, F.; CAVE, A.; PAULO, M.D.; FOURNET, A. 1996. Pesseoine and spinosine, two catecholic berbines from *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products**, **59**: 438-440.

RIESER, M.J.; GU, Z.M.; WOOD., K.V.; MCLAUGHLIN, J.L. 1996. Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from seeds of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, **59**: 100-108.

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

ROBBRECHT, E. 1988. Tropical woody Rubiaceae. **Opera Botanica Belgica**, **1**: 1-127.

ROBINSON, T.W. 1991. **The organic constituents of highest plant: their chemistry and interrelationships**. 6th ed. Cordus Press, North Amherst.

ROCKENBACH, J.; NAHRSTEDT, A.; WRAY, V. 1992. Cyanogenic glycosides from *Psydrax* and *Oxyanthus* species. **Phytochemistry**, **31** (2): 567-570.

SAKAI, S. 1995. Chemical studies of indole alkaloids. **Yakugaku Zasshi - Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, **115** (5): 351-369.

SANG, S.M.; HO, C.T. 2006. Chemical components of noni (*Morinda citrifolia* L.) root. **Herbs: Challenges in Chemistry and Biology**, **925**: 185-194.

SANOGO, R.; GERMANÓ, M.P.; De PASQUALE, R.; KEITA, A.; BISIGNANO, G. 1996. Selective antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* Zucc against *Candida* and *Staphylococcus* sp. **Phytomedicine**, **2**: 265-268.

SANTOS-CERVANTES, M.E.; IBARRA-ZAZUETA, M.E.; LOARCA-PINA, G.; PAREDES-LOPEZ, O.; DELGADO-VARGAS, F. 2007. Antioxidant and antimutagenic activities of *Randia echinocarpa* fruit. **Plant Foods for Human Nutrition**, **62 (2)**: 71-77.

SATO, M.; FUJIWARA, S.; TSUCHIYA, H.; FUJII, T.; IINUMA, M.; TOSA, H.; OHKAWA, Y. 1996. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, **54**: 171-176.

SCALBERT, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, **30**: 3875-3883.

SCHERRER, R.; GERHARDT, P. 1971. Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. **Journal of Bacteriology**, **107**: 718-735.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. 2002. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **50**: 2432-2438.

SEN, G.; MANDAL, S.; ROY, S.S.; MUKHOPADHYAY, S.; BISWAS, T. 2005. Therapeutic use of quercetine in the control of infection and anemia associated with visceral leishmaniasis. **Free Radical Biology and Medicine**, **38**: 1257-1264.

SETZER, W.N.; NOLETTO, J.A.; LAWTON, R.O. 2006. Chemical composition of the floral essential oil of *Randia matudae* from Monteverde, Costa Rica. **Flavour and Fragrance Journal**, **21 (2)**: 244-246.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. 1995. **Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications**. Lancaster PA: Technomic Publishing Co Inc.

SHAW, J.J. 1994. Taxonomic of the genus *Leishmania*: present and future trends and their importance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **89**: 471-478.

SIDDIQUI, B.S.; SATTAR, F.A.; BEGUM, S.; GULZAR, T.; AHMAD, F. 2006. New anthraquinone from the stem of *Morinda citrifolia* Linn. **Natural Product Research**, **20 (12)**: 1136-1144.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology Reviews**, **59**: 201-222.

SILVA, I.; FRANCO, S.L.; MOLINARI, S.L.; CONEGERO, C.I.; NETO, M.H.M.; CARDOSO, M.L.C.; SANT'ANA, D.M.G.; WANKO, N.S. 1995. **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais**. 3 ed. Cascavel: Assoeste. 203 p.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. 1999. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFSC.

SINGH, K.V.; SHUKLA, N.P. 1984 Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia**, **55**: 313-315.

SKANDAMIS, P.N.; NYCHAS, G.J.E. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. **Journal of Applied Microbiology**, **91**: 1011-1022.

SOARES, S.E. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, **15**: 71-81.

SOBERON, J.R.; SGARIGLIA, M.A.; SAMPIETRO, D.A. 2007. Antibacterial activity of plants extracts from northwestern Argentina. **Journal of Applied Microbiology**, **102 (6)**: 1450-1461.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2005. **Botânica Sistemática**. Instituto Plantarum de Estudos de Flora Ltda., Brasil, pp. 468-469.

SOUZA, J.J.; VIEIRA, I.J.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R. 2004. **27º Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Salvador, Bahia. Livro de Resumos, PN-306.

SRIKUMAR, R.; PARTHASARATHY, N.J.; SKANKAR, E.M. 2007. Evaluation of the growth inhibitory activities of triphala against common bacteria isolates from HIV infected patients. **Phytotherapy Research**, **21 (5)**: 476-480.

STAERK, D.; LEMMICH, E.; CHRISTENSEN, J.; KHARAZMI, A.; OLSEN, C.E.; JAROSZEWSKI, J.W. 2000. Leishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of indole alkaloids from *Corynanthe pachyceras*. **Planta Medica**, **66**: 531.

STEFFENS, J.J.; PELL, E.J.; TIEN, M. 1996. Mechanisms of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. **Current Opinion in Biotechnology**, **7(3)**: 348-355.

STERN, J.L.; HAGERMAN, A.E.; STEINBERG, P.D.; MASON, P.K. 1996. Phlorotannin-protein interactions. **Journal of Chemical Ecology**, **22**: 1887-1899.

STREGE, M.A. 1999. High performance liquid chromatographic electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening. **Journal of Chromatography**, **725**: 67- 78.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. 1991 In: **Methods in Plant Biochemistry V1**, Academic Press, New York, p. 71.

TAKAYAMA, H.; AIMI, N.; SAKAI, S. 2000. Chemical studies on the analgesic indole alkaloids from the traditional medicine (*Mitragyna speciosa*) used for opium substitute. **Yakugaku Zasshi - Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, **120 (1)**: 959-967.

TAYLOR, R.S.; MANANDHAR, N.P.; TOWERS, G.H.N. 1995. **Journal of Ethnopharmacology**, **46(3)**: 153-159.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHIMIDT, T.J.; TOSUN, F.; RUEDI, P. 2006. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **50**: 1352-1364.

TERRAS, F.R.G.; SCHOOF, H.M.E.; THEVISSSEN, H.M.E.; BROEKAERT, W.F. 1993. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oil seed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiology**, **103**:1311-1319.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. 1997. **Herbarium compêndio de fitoterapia**. 3 ed. Curitiba: Herbarium. 317p.

TOMAS-BARBERAN, F.; INIESTA-SANMARTIN, E.; TOMAS-LORENTE, F.; RUMBERO, A. 1990. Antimicrobial phenolic compounds from three Spanish *Helicrysum* species. **Phytochemistry**, **29**: 1093-1095.

TORSSEL, B.G. 1989. **Natural product chemistry. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism**. New York: John Willey,. 401 p.

TRABULSI, I.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. 1999. **Microbiologia**. 3^a ed. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, RJ.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; IINUMA, M.; YOKOYAMA, J.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; TAKASE, I.; NAMIKAWA, I. 1994. Inhibition of the growth of cariogenic bacteria *in vitro* by plant flavanones. **Experientia**, **50**: 846-849.

URS, N.V.R.R.; DUNLEAVY, J.M. 1975. Enhancement of the bactericidal activity of a peroxidase system by phenolic compounds (*Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis*, soybeans). **Phytopathology**, **65**: 686-690.

VERPOORTE, R. 1998. Exploration of nature's chemodiversity: The role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, **3**: 232-238.

VICKERY, M.L.; VICKERY, B. 1981. **Secondary metabolism**. The Macmillan Press Ltd., Hong Kong.

WASIKY, R.; AKISUE, G. 1969. Um novo aparelho aperfeiçoado para extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, **7**: 399-405.

WHO, 2003. *In: Tropical Diseases*. Progress in Research, 1989-1990. Tenth Program report of the UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). 79-87. WHO, Geneva.

YEN, G.C.; DUH, P.D.; CHANG, D.Y. 2000. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. **Food Chemistry**, **70 (4)**: 437-441.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **43**: 27-32.

ZANA, M.; JANKA, Z.; KÁLMÁN, J. 2006. **Oxidative stress: A bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease.** Neurobiology of Angin. In press.

ZANI, C.L.; CHAVES, P.P.G.; QUEIROZ, R.; De OLIVEIRA, A.B.; CARDOSO, J.E.; ANJOS, A.M.G.; GRANDI, T.S.M. 1995. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanossoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, **2**: 47-50.

ZHAO, W.M.; WOLFENDER, J.L.; HOSTETTMANN, K.; CHENG, K.F.; XU, R.S.; QIN, G.W. 1997. Triterpenes and triterpenoid saponins from *Mussaenda pubencens*. **Phytochemistry**, **45 (5)**: 1073-1078.

ZHANG, Z.; ELSOHLY, H.N.; JACOB, M.R.; PASCO, D.S.; WALKER, L.A.; CLARK, A.M. 2002. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Tovomita krukovii*. **Planta Medica**, **68**: 49-54.

ZHANG, Y.; LEWIS, K. 1997. Fabatins: new antimicrobial plant peptides. **FEMS Microbiological Letters**, **149**: 59-64.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **49**: 5165-5170.

ZIN, Z.M.; HAMID, A.A.; OSMAN, A.; SAARI, N.; MIRSAN, A. 2007. Isolation and identification of antioxidative compound from fruit of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). **International Journal of Food Properties**, **10 (2)**: 363-373.

ANEXO A - Artigo aceito na revista Journal of Ethnopharmacology intitulado: "Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil".