

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO-USP

**Avaliação das atividades antimicrobiana, antisséptica e
esterilizante de extratos e metabólitos de *Baccharis dracunculifolia*
D. C. e *Pinus elliottii* Engelm**

CRISTIANE TEIXEIRA VILHENA BERNARDES

RIBEIRÃO PRETO
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO-USP

**Avaliação das atividades antimicrobiana, antisséptica e
esterilizante de extratos e metabólitos de *Baccharis dracunculifolia*
D. C. e *Pinus elliottii* Engelm**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Orientada: Cristiane Teixeira Vilhena
Bernardes

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

RIBEIRÃO PRETO
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Bernardes, Cristiane Teixeira Vilhena

Avaliação das atividades antimicrobiana, antisséptica e esterilizante de extratos e metabólitos de *Baccharis dracunculifolia* DC e *Pinus elliottii* Engelm. Ribeirão Preto, 2014.

167 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Bastos, Jairo Kenupp.

1. *B. dracunculifolia*. 2. Antimicrobiano. 3. Esterilizante

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Cristiane Teixeira Vilhena Bernardes

Título do trabalho: Avaliação das atividades antimicrobiana, antisséptica e esterilizante de extratos e metabólitos de *Baccharis dracunculifolia* DC e *Pinus elliottii* Engelm

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Aprovada em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICO ESTE TRABALHO:

Aos meus amados pais, **Elisabeth e Luiz Augusto**, que sempre estiveram do meu lado em todos os momentos, bons, ruins e nas aventuras malucas que eu já inventei para minha vida. Que sempre me deram força e amparo para continuar mesmo quando a vontade de desistir era grande. Vocês são exemplos de perseverança e força, minha base e meu porto seguro. Obrigada por cada palavra, cada gesto de carinho. Obrigada pelo apoio e amor incondicional sempre. AMO MUITO VOCÊS!!!!

Aos meus irmãos Daniel e Iara, que mesmo distante estavam sempre perto do coração e presentes em pensamento. Pela paciência, compreensão, amizade, carinho e amor. Vocês são o meu orgulho e sou abençoada por tê-los em minha vida. Obrigada também por terem colocado em nossas vidas duas pessoas tão especiais como a Vaninha e o Marcelo. Amuuuu demais!!!!

Às minhas sobrinhas, Giovana, Maria Luisa e Isadora, pontinhos de luz em nossas vidas, que vieram para me mostrar o que é o amor puro e verdadeiro. Vocês são fonte de amor e alegria, amores lindos do meu coração.

À minha família adotiva, minha irmã loira Ana Silvia, minhas irmãzinhas Ana Paula e Ana Lúcia, meus pais adotivos Tia Bia e Tio Cebola, que me acolheram desde antes de eu vir para Ribeirão Preto e que sempre estiveram comigo durante toda essa jornada. Vocês sempre serão minha família onde quer que eu esteja. Amo vocês.

Às minhas avós Maria e Luzia, mulheres forte e exemplos de perseverança, por todo carinho, amor e orações sem cessar. Amor incondicional.

Ao meu namorado José Antônio e sua família, que tanto me apoiaram nessa etapa final do meu doutorado, muito obrigada por tudo que fizeram por mim, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, pela acolhida e orientação durante a realização do trabalho.

A Profa. Dra. Niece A. J. C. Furtado pela colaboração e apoio nos experimentos de microbiologia.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, pela colaboração e apoio com a realização dos experimentos em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Fernando Batista da Costa, pela disponibilidade e auxílio.

À Profa. Dra. Maria José Fonseca Vieira e ao funcionário José Roberto Jabor pela ajuda e disponibilidade.

Aos funcionários do laboratório de Farmacognosia Angélica, Walter Lopes e Mário, pelo apoio e por toda disponibilidade em ajudar sempre.

Aos funcionários Izabel Cristina Casanova Turatti e José Carlos Tomaz pelas análises realizadas no NPPNS.

Ao funcionário Vinícius Palaretti, pela dedicação e paciência na aquisição dos espectros de RMN.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

À todos os funcionários da Pós Graduação, em especial Eleni e Rafael, muito obrigada pela ajuda e paciência sempre.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e a todos os funcionários dessa instituição, que desde a minha chegada me acolheram e me ajudaram em tudo

Aos funcionários da segurança e limpeza, que me socorreram em vários momentos, obrigada pela companhia aos finais de semana e feriados e por zelarem por mim e pelos meus amigos.

À agência de fomento CAPES pela bolsa concedida no início do meu doutorado.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Farmacognosia Ana Paula, Anny, Bruno, Carol, Camila, Daniela Chagas, Danniel Faleiro, Eliane, Erick, Fabian, Federico, Felipe, Gari, Ingrid, Jéssica, João Luis, Jonas, Juliana, Lucas, Marcela, Marcelo, Marivane, Mariza, Mauro, Rejane, Ricardo Furtado, Ricardo Rodrigues, Rosana, Tatiane, Tiago. Muito obrigada pela acolhida, parceria e amizade sempre.

Aos amigos de outros laboratórios Soninha, Fernanda, Fran, Johara, Fernando, Greyce, Ivan, Bianca, Gabi, João Henrique, Camila, Maria Elvira, Andrea.

Aos participantes da comissão organizadora do V SINPOSPq, muito obrigada pela oportunidade de participar da organização desse evento e aprender tanto com a companhia de vocês.

À todos os meus amigos que aceitaram minha ausência em várias ocasiões

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço especialmente à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela bolsa concedida através da aprovação do processo n° 2010/09861-0.

**A luta pela vida nem sempre é vantajosa
aos fortes, nem aos espertos.
Mas cedo ou mais tarde, quem cativa a vitória
É aquele que crê plenamente:
Eu conseguirei!**

Napoleon Hill

RESUMO

BERNARDES, C.T.V. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antisséptica e esterilizante de extratos e metabólitos de *Baccharis dracunculifolia* DC e *Pinus elliottii* Engelm.** 2014. 167p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Baccharis dracunculifolia, conhecida popularmente como “alecrim do campo” é um arbusto lenhoso, nativo das regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, muito utilizada na medicina popular como agente anti-inflamatório e no tratamento de doenças gastrointestinais e úlceras, sendo relatadas ainda atividades antibacteriana, antifúngica e antiparasitária. *Pinus elliottii* é uma espécie exótica, que foi introduzida no sudeste brasileiro como espécie de reflorestamento e se espalhou rapidamente. As plantas desse gênero são ricas em componentes fenólicos e terpenos, dos quais alguns diterpenos apresentam atividade antimicrobiana. Com a ressurgência de micro-organismos resistentes à ação dos antimicrobianos, há interesse em se investigar novas substâncias para o tratamento de infecções tópicas e sistêmicas, bem como o desenvolvimento de produtos antissépticos ou esterilizantes, para serem empregados em ambientes domésticos, industriais e hospitalares. No presente estudo foram obtidos os extrato das partes aéreas e raízes de *B. dracunculifolia* (Extrato BD e BD-R) por meio de processo de maceração em solução hidroalcoólica 96:4 e o extrato do lavado glandular das folhas de *B. dracunculifolia* (BD-L). Os extratos foram submetidos a diferentes modalidades cromatográficas e avaliações antimicrobianas. O Extrato BD foi submetido a fracionamento em HSCCC (cromatografia de contracorrente em alta velocidade) associado a CLAE-PREP, fornecendo a flavona hispidulina, o flavononol aromadendrina 4'-*O*-metil éter e o fenilpropanoide ácido *p*-cumárico. A Fração BD-RH foi submetida a fracionamento por coluna clássica e duas das frações resultantes foram submetidas a processo de recristalização fornecendo os triterpenos óxido de baccharis e o friedelanol. Frações do extrato BD-L foram submetidas a fracionamento por cromatografia líquida a vácuo (CLV) e coluna clássica, resultando em 30 frações que foram submetidas a CLAE-PREP, fornecendo a flavanona isosakuranetina e o flavonol 3-*O*-metil-kaempferol. Obteve-se também o extrato da resina de *P. elliottii* que foi submetido à hidrodestilação em Clevenger para a retirada de sua fração volátil e o decocto restante foi particionado com AcOEt o que possibilitou a obtenção do extrato da resina de *P. elliottii* (extrato PE). O extrato foi submetido a CLAE-PREP fornecendo o ácido deidroabiético. Para os extratos BD e PE foram determinadas as atividades frente as micobactérias *M. avium*, *M. kansasii*, *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* e *M. bovis*, utilizando-se a metodologia para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Ambos os extratos apresentaram-se ativos frente as micobactérias testadas, exceto o extrato de *B. dracunculifolia* frente a *M. smegmatis*. Avaliaram-se também as atividades antibacteriana e antifúngica do extrato das folhas de *B. dracunculifolia*, suas frações e substâncias isoladas, bem como de padrões comerciais de *B. dracunculifolia*. Foram também avaliados o extrato BD-L e o extrato BD-R, bem como o extrato PE e a substância majoritária isolada do mesmo. As atividades foram avaliadas para determinação da CIM frente às bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*, *E. coli*, *B. subtilis*, *H. pylori* e aos fungos *T. mentagrophytes* e *C. albicans*. Nenhum extrato, ou fração de *B. dracunculifolia* foi ativo frente às bactérias GRAM- e somente a substância isosakuranetina foi ativa frente a *S. choleraesuis*, mas sem capacidade bactericida. O extrato PE foi ativo frente a todos os micro-organismos avaliados, exceto *E. coli*. O ácido deidroabiético, isolado do mesmo, foi ativo frente a todos os micro-organismos, exceto as bactérias GRAM-. Avaliou-se também a associação dos extratos de *B. dracunculifolia*, suas frações, bem como o extrato de *P. elliottii*, em concentrações sub-inibitórias em associação aos antimicrobianos de uso comercial, frente aos mesmos micro-organismos avaliados para a determinação da CIM. Observou-se uma interação negativa dos extratos e frações de *B. dracunculifolia* com o antifúngico cetoconazol que

apresentou valores de CIM mais elevados quando associado aos extratos e frações em comparação ao observado sem a associação. Apenas o extrato da resina de PE reduziu os valores de CIM quando associado ao cetoconazol. Já quando associados ao antifúngico fluconazol observou-se uma interação benéfica entre todos os extratos e frações avaliados, observando-se como melhor resultado a redução dos valores de CIM de 512 µg/mL para 2 µg/mL quando o fluconazol foi associado à fração F. AcOEt BD (50 µg/mL), reduzindo também os valores de CFM de 512 µg/mL para 64 µg/mL, o que indica a possibilidade de associação entre o antifúngico comercial e os extratos BD e PE como uma nova abordagem frente a crescente resistência aos antimicrobianos disponíveis no mercado. Avaliou-se também o potencial desinfetante bactericida da solução hidroalcoólica de *B. dracunculifolia* a 0,2% em álcool 40° GL, a qual foi efetiva frente às bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis* e *E. coli*. Avaliou-se também a atividade desinfetante fungicida frente a *T. mentagrophytes*, das soluções hidroalcoólicas a 0,2% à 40°GL de *B. dracunculifolia* e de *P. elliotti*, bem como da solução hidroalcoólica 40°GL, como controle. Ambas apresentaram-se ativas e o controle não foi ativo contra os micro-organismos avaliados. Os extratos a 0,2% em álcool 40°GL foram melhores do que os observados na determinação da CIM. Portanto, sugere-se que o álcool 40°GL esteja agindo como um adjuvante possibilitando melhor atividade ao extrato. As soluções de *B. dracunculifolia* e de *P. elliotti* separadas e em associação foram avaliadas para determinar a atividade desinfetante esporocida frente aos micro-organismos *B. subtilis* e *C. sporogenes*, mas não foram ativas. Conclui-se que as duas plantas avaliadas apresentam potencial para o desenvolvimento de produtos antimicrobianos, destacando-se o efeito sinérgico dos extratos em associação com o fluconazol.

Palavras chave: *B. dracunculifolia*, *P. elliottii*, antimicrobiano, esterilizante

ABSTRACT

BERNARDES, C. T. V. **Evaluation of the antimicrobial, antiseptic and sterilant activities of extracts and metabolites from *Baccharis dracunculifolia* DC and *Pinus elliottii* Engelm.** 2014. 167 p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Baccharis dracunculifolia (Asteraceae) popularly known as “alecrim do campo” is a woody shrub, native from the southeast of Brazil, widely used in folk medicine for the treatment of inflammatory and gastrointestinal diseases. Antibacterial, antifungal and anti-parasitic activities were also reported. *Pinus elliottii* is an exotic species that was introduced in southeast of Brazil as a reforestation specie and spread rapidly. *Pinus* plants are rich in phenolic components and terpenes, and some diterpenes display antimicrobial activity. With the resurgence of antimicrobial resistant microorganisms, there is a growing interest in investigating new substances for the treatment of topical and systemic infections, as well as the development of sterilizing or antiseptic products to be used in domestic, industrial and hospital. In the present study we have obtained the extracts of aerial parts (BD) and roots (BD-R) of *B. dracunculifolia*, by maceration process using aqueous ethanol 96:4, along with its leaves rinsed extract (BD- L). The extracts were submitted to different chromatographic techniques and the obtained fractions and isolated compounds were submitted to antimicrobial evaluation. The BD extract was partitioned using an apparatus for high-speed countercurrent chromatography, followed by preparative HPLC, furnishing the flavone hispidulin, flavonol aromadendrin-4-*O*-methyl-ether and the phenylpropanoid *p*-coumaric acid. The BD-RH fraction was subjected to fractionation by classical column and two of the resulting fractions were subjected to recrystallization process furnishing the triterpenes baccharis oxide and friedelinol. Fractions from BD-L extract were submitted to fractionation by vacuum liquid chromatography (CLV), classical column and preparative HPLC furnishing the flavanone isosakuranetin and flavonol 3 - *O* - methyl - kaempferol. The *P. elliottii* the resin was subjected to hydrodistillation in Clevenger for the separation of its volatile fraction, and decoction water was partitioned with EtOAc to furnish the fixed components fraction of *P. elliottii* resin (PE extract), which was submitted to preparative HPLC to furnish dehydroabiatic acid. The activity of BD and PE extracts were determined against *Mycobacterium avium*, *M. kansasii*, *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* and *M. bovis*, using the methodology for determining the minimum inhibitory concentration (MIC). Both extracts showed activity against all mycobacteria tested, except for the BD extract against *M. smegmatis*. It was also evaluated the antibacterial and antifungal activities of the *B. dracunculifolia* extract, fractions, isolated and commercial available compounds along with BD-R, BD-L and dehydroabiatic acid. The antimicrobial activities were evaluated by MIC determination against the bacterias *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*, *E. coli*, *B. subtilis*, *H. pylori* and fungi *T. mentagrophytes* and *C. albicans*. Neither extract nor *B. dracunculifolia* fraction were active against GRAM- microorganisms, except isosakuranetin that was active against *S. choleraesuis*, but not with bactericidal activity. PE extract was active against all microorganisms assessed, except for *E. coli*. The dehydroabiatic acid was active against all microorganisms except for GRAM- bacteria. *B. dracunculifolia* extract were combined with *P. elliottii* extract, as well as in sub-inhibitory concentrations, in combination with antimicrobial drugs, against the same tested microorganisms. It was observed a negative interaction of all extracts and fractions of *B. dracunculifolia* with the antifungal ketoconazole, which displayed higher MIC values when combined. Only PE extract lead to a reduction in MIC values in combination with ketoconazole. However, for antifungal fluconazole all samples diminished the MIC values. The best result was observed when fluconazole was associated with

BD EtOAc fraction (50 µg/mL) leading to a reduction of MIC values from 512 µg/mL to 2 µg/mL, which should be considered for further development to face antimicrobial resistance. It was assessed the potential bactericidal disinfectant potential of *B. dracunculifolia* extract 0.2% in 40 °GL alcohol, which was effective against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis* and *E. coli*. I was also evaluated the disinfectant fungicidal activity of the hydroalcoholic solutions of 0.2% *B. dracunculifolia* and *P. Elliottii*, extracts in 40° GL, as well as the 40 °GL alcohol solution as control. Both extracts solutions were active against *T. mentagrophytes*, and the control was not active. The activities of 0.2% extracts in alcohol 40 ° GL were better than those observed in the MIC determination without ethanol. Therefore, it is suggested that ethanol 40° GL is acting as an adjuvant allowing better activity of the extract. Solutions of *B. dracunculifolia* and *P. Elliottii* extracts, alone and in combination were inactive in the sporicidal disinfectant assay against *B. subtilis* and *C. sporogenes*. Overall, the two plants have the potential for the development of antimicrobial products, especially with regards to the synergistic effect of the extracts in combination with fluconazole.

Keywords: *B. dracunculifolia*, *P. Elliottii*, antimicrobial, sterilant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotos da coleta e secagem das partes aéreas de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	9
Figura 2. Fotos da coleta de resina da espécie <i>Pinus elliottii</i>	13
Figura 3. Partição do extrato de <i>B. dracunculifolia</i> com rendimento das frações.	26
Figura 4. Cristais da substância BdR-1.	39
Figura 5. Cristais da Substância BdR-2.	39
Figura 6. Perfis cromatográficos obtidos em CLAE-UV-DAD (300 nm) do extrato hidroalcoólico de <i>B. dracunculifolia</i> (A) e das frações BD31-36 (B), BD37-43 (C) das quais foi isolado o composto 1. Da fração BD43-46 (D) da qual foi isolado o composto 2 e da fração BD48-53 (E) da qual foi isolado o composto 3. Utilizou-se coluna C18 (4,6 mm ID x 25 mm). Fase móvel : água acidificada (Ác. Acético 0,1%): MeOH; eluição em modo gradiente 20% - 100% MeOH em 70 min; vazão: 0,8 mL/ min.	73
Figura 7. Estrutura química do composto BD-1.	76
Figura 8. Estrutura química do composto BD-2.	78
Figura 9. Estrutura química do composto BD-3.	80
Figura 10. Estrutura química do composto BdL-1.	82
Figura 11. Estrutura química da substância BdL-2.	84
Figura 12. Estrutura química da substância BdR-1.	86
Figura 13. Estrutura química da substância BdR-2.	89
Figura 14. Perfis cromatográficos obtidos em CLAE-UV-DAD do extrato de <i>P. elliottii</i> (A) e das substâncias isoladas por CLAE-PREP (B) e (C). Os números 1 e 4 indicam os picos das substâncias que estavam presentes no extrato e seus perfis após o isolamento.	94
Figura 15. Perfil cromatográfico obtido por CG-EM para a substância isolada Pe- 1 (A) e perfil obtido para substância isolada Pe – 4 (B). Espectro de fragmentação da substância Pe-1 (C), espectro de fragmentação de massas da biblioteca (NIST08.LIB) para as substâncias ácido deidroabiético (D).	95
Figura 16. Estrutura química do composto Pe-1.	95

Figura 17. Estruturas químicas e massas moleculares das substâncias avaliadas para atividade antimicrobiana e dos antimicrobianos utilizados como padrão nos ensaios para determinação da CIM.....	104
Figura 18. Avaliação da atividade desinfetante bactericida da solução hidroalcoólica contendo 0,2% de extrato de <i>B. dracunculifolia</i> em álcool 40°GL, frente aos micro-organismos <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> , após 10 minutos de exposição dos cilindros à solução.	122
Figura 19. Resultados dos controles para o experimento da determinação da atividade desinfetante bactericida. (1) subcultura e re-subcultura dos micro-organismos expostos somente ao álcool 40 °GL, após 10 minutos de exposição dos cilindros à solução, (2) controle de viabilidade do meio de subcultura (3) controle de esterilidade de cilindros carreadores e meio de subcultura.....	123
Figura 20. Avaliação da atividade desinfetante fungicida das soluções <i>B. dracunculifolia</i> 0,2% em álcool 40 °GL, <i>P. elliottii</i> 0,2% em álcool 40 °GL, avaliação do álcool 40°GL e os controles do experimento. Controle da suspensão de conídios frente solução de fenol 1/70 e 1/60, controle de viabilidade do meio de subcultura, controle de esterilidade do meio de subcultura e controle de esterilidade da água usada para o preparo das diluições de fenol.....	125
Figura 21. Avaliação da atividade esporocida da solução hidroalcoólica contendo extrato de <i>B. dracunculifolia</i> 0,2% em álcool 40°GL, frente aos micro-organismos <i>B. subtilis</i> e <i>C. sporogenes</i> , após os tempos de 5, 10 e 15 minutos de exposição.....	127
Figura 22. Avaliação da atividade esporocida da solução hidroalcoólica contendo extrato de <i>P. elliottii</i> 0,1% em álcool 40°GL, solução hidroalcoólica contendo extrato de <i>P. elliottii</i> 0,2% em álcool 40°GL e associações dos mesmos a 0,2 % de extrato de <i>B. dracunculifolia</i> , frente ao micro-organismo <i>B. subtilis</i> , após 30 minutos de exposição.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massas dos extratos e das frações obtidas por partição líquido-líquido.....	28
Tabela 2. Proposta inicial do sistema de solvente para fracionamento do extrato bruto de <i>Baccharis dracunculifolia</i> por CCC.....	29
Tabela 3. Desenvolvimento de proporção ideal do sistema de solventes para fracionamento do extrato bruto de <i>B. dracunculifolia</i> por CCC.	31
Tabela 4. Sistema de solventes utilizado para fracionamento do extrato bruto de <i>B. dracunculifolia</i> por CCC.....	32
Tabela 5. Fracionamento do extrato bruto de <i>B. dracunculifolia</i> (1,0 g) por CCC, utilizando coluna C (105 mL).....	34
Tabela 6. Primeiro fracionamento do extrato bruto de <i>B. dracunculifolia</i> (2,5 g) por CCC, utilizando coluna A (208 mL).	34
Tabela 7. Segundo fracionamento do extrato bruto de <i>B. dracunculifolia</i> (2,5 g) por CCC, utilizando coluna A (208 mL).	34
Tabela 8. Fracionamento do extrato bruto de <i>B. dracunculifolia</i> (2,5 g) por CCC, utilizando as colunas C e D acopladas (207 mL).....	35
Tabela 9. Sistema de solventes utilizados e frações obtidas a partir da cromatografia líquida a vácuo, assim como suas respectivas massas.....	36
Tabela 10. Frações obtidas da cromatografia clássica da fração BD-HLAc I-VI.	37
Tabela 11. Frações obtidas do fracionamento em coluna clássica da fração BD-RH.	38
Tabela 12. Gradiente de solventes utilizado como fase móvel para análise em CLAE das frações obtidas pelo fracionamento do extrato de <i>B. dracunculifolia</i>	41
Tabela 13. Gradiente de solventes utilizado como fase móvel para análise em CLAE do extrato de <i>P. elliottii</i> e substâncias isoladas do mesmo.	43
Tabela 14. Dados dos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C e HMBC obtidos do composto BD-1 (hispidulina) e dados de ¹ H da literatura.	77
Tabela 15. Dados dos espectros de RMN ¹ H obtidos do composto BD-2 (aromadendrina-4'- <i>O</i> -metil-éter) e dados de RMN ¹ H da literatura.....	79

Tabela 16. Dados dos espectros de RMN ^1H obtidos do composto BD-3 (ácido <i>p</i> -cumárico) e dados de RMN ^1H da literatura.	81
Tabela 17. Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , obtidos do composto BdL-1 (isosakuranetina) e dados de RMN ^1H e ^{13}C da literatura.	83
Tabela 18. Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C obtidos do composto BdL-2 (3 - <i>O</i> - metil - kaempferol) e dados de RMN ^1H e ^{13}C da literatura.	85
Tabela 19. Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C obtidos do composto BdR-1(óxido de baccharis) e dados de RMN ^1H e ^{13}C da literatura.	88
Tabela 20. Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , obtidos do composto BdR-2 (friedelanol) e dados de ^1H e ^{13}C da literatura.....	91
Tabela 21. Constituintes químicos presentes na fração volátil da resina de <i>P. elliotii</i>	93
Tabela 22. Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , obtidos do composto Pe-1 (ácido deidroabiético) e dados de ^1H e ^{13}C da literatura.....	97
Tabela 23. Ensaio <i>in vitro</i> para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos e frações de <i>B. dracunculifolia</i> (BD).....	100
Tabela 24. Avaliação <i>in vitro</i> para determinação da atividade antibacteriana de substâncias isoladas e padrões de <i>B. dracunculifolia</i>	103
Tabela 25. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica de extratos e frações de <i>B. dracunculifolia</i>	105
Tabela 26. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica de substâncias isoladas e padrões obtidos de <i>B. dracunculifolia</i>	107
Tabela 27. Avaliação <i>in vitro</i> das atividades antibacteriana e antifúngica do extrato e substância isolada de <i>P. elliotii</i> , obtido para determinação da concentração inibitória mínima.	110
Tabela 28. Concentrações dos extratos e frações de <i>B. dracunculifolia</i> e do extrato de <i>P. elliotii</i> que foram associadas aos antimicrobianos para avaliação da interação entre os mesmos.	113
Tabela 29. Avaliação da interação entre antibacterianos de uso comercial, extratos e frações de <i>B. dracunculifolia</i> e extrato de <i>P. elliotii</i> pela determinação da CIM com e sem associações.....	114

Tabela 30. Concentrações dos extratos e frações de <i>B. dracunculifolia</i> e do extrato de <i>P. Elliottii</i> que foram associadas aos antimicrobianos para avaliação da interação entre os mesmos.	116
Tabela 31. Avaliação da interação entre antifúngicos de uso comercial, extratos e frações de <i>B. dracunculifolia</i> e extrato de <i>P. Elliottii</i> , pela determinação da CIM com e sem associações.	117
Tabela 32. Ensaio <i>in vitro</i> para determinação da CIM dos extratos de <i>B. dracunculifolia</i> e <i>P. Elliottii</i> frente à micobactérias.	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
ACN	Acetonitrila
ATCC	American Type Culture Collection
BD-L	Extrato de lavado glandular de <i>B. dracunculifolia</i>
BD-Lac	Fração acetato de etila do extrato BD-L
BD-LAq	Fração aquosa do extrato BD-L
BD-LH	Fração hexânica do extrato BD-L
BD-R	Extrato hidroalcoólico bruto das raízes de <i>B. dracunculifolia</i>
BD-RAc	Fração acetato de etila do extrato BD-R
BD-RAq	Fração aquosa do extrato BD-R
BD-RH	Fração hexânica do extrato BD-R
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCC	Cromatografia de contracorrente
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG-EM	Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE – PREP	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em modo preparativo
CLV	Cromatografia Líquida a Vácuo
δ	Deslocamento químico
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
Extrato BD	Extrato Hidroalcoólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i>

Extrato PE	Extrato da resina de <i>Pinus Elliottii</i>
F. AcOEt	Fração em acetato de etila do extrato BD
F. CH ₂ Cl ₂	Fração diclorometanólica do extrato BD
F. hexânica BD	Fração hexânica do extrato BD
F. <i>n</i> -BuOH BD	Fração em <i>n</i> -butanol do extrato BD
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSCCC	High Speed Countercurrent Chromatography
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
m/z	Razão massa carga
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
<i>n</i> - BuOH	<i>n</i> - butanol
MeOH	Metanol
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
SFB	Soro Fetal Bovino
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	2
1.2 PRODUTOS NATURAIS	4
1.3 GÊNERO <i>Baccharis</i>	5
1.4 <i>Baccharis dracunculifolia</i>	8
1.5 O GÊNERO <i>Pinus</i> E A ESPÉCIE <i>Pinus elliottii</i>	12
1.6 NOVAS ABORDAGENS FRENTE A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	16
1.7 SANITIZANTES, DESINFETANTES, ANTISSÉPTICOS E ESTERILIZANTES	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>B. dracunculifolia</i>	25
3.2 COLETA E ESTABILIZAÇÃO DAS FOLHAS DE <i>B. dracunculifolia</i> PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO DE LAVAGEM DE TRICOMAS FOLIARES (BD-L)	26
3.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS RAÍZES DE <i>B. dracunculifolia</i>	27
3.4 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BD-R E BD-L POR PARTIÇÃO LIQUIDO-LIQUIDO	27
3.5 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE <i>B. dracunculifolia</i> POR CROMATOGRAFIA DE CONTRACORRENTE (CCC).....	28

3.6	ESCOLHA DOS SOLVENTES PARA O DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE SOLVENTES.....	29
3.7	PREPARO DO SISTEMA DE SOLVENTES E AMOSTRA PARA CCC.....	32
3.8	FRACIONAMENTO DO EXTRATO DE <i>B. dracunculifolia</i> POR CCC	33
3.9	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA A VÁCUO (CLV) DA FRAÇÃO BD-LAc	35
3.10	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM COLUNA CLÁSSICA DE FRAÇÕES DO LAVADO DE TRICOMAS GLANDULARES DAS FOLHAS DE <i>B. dracunculifolia</i>	36
3.11	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA CLÁSSICA DA FRAÇÃO BD-RH	37
3.12	PURIFICAÇÃO POR RECRISTALIZAÇÃO DAS FRAÇÕES DE BD-RH.....	38
3.13	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR CCDC E PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE-UV-DAD PARA OS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>B. dracunculifolia</i>	40
3.14	ISOLAMENTO DE COMPOSTOS DE <i>B. dracunculifolia</i> EM CLAE-PREP.....	41
3.15	OBTENÇÃO DO EXTRATO DE <i>Pinus elliottii</i> E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS PARA AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA.....	42
3.16	ANÁLISE DO EXTRATO DA RESINA DE <i>P. elliottii</i> POR CLAE EM MODO ANALÍTICO E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS DE <i>P. elliottii</i> POR CLAE-PREP	42
3.17	ANÁLISE DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE <i>P. elliottii</i> E DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS A PARTIR DA FRAÇÃO FIXA DA RESINA, POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM).....	43
3.18	IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	44
3.19	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA FRENTE A BACTÉRIAS AERÓBIAS	45
3.19.1	<i>Micro-organismos</i>	45
3.19.2	<i>Atividade antibacteriana</i>	45
3.19.3	<i>Preparo do inóculo</i>	45
3.19.4	<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)</i>	46

3.19.5	Determinação dos resultados	47
3.20	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	47
3.20.1	Micro-organismos	47
3.20.2	Atividade antifúngica.....	47
3.20.3	Preparo do inoculo de <i>T. mentagrophytes</i>	48
3.20.4	Determinação da CIM e concentração fungicida mínima e (CFM) frente a <i>T. mentagrophytes</i>	48
3.20.5	Preparo do inoculo de <i>C. albicans</i>	49
3.20.6	Determinação da CIM e CFM frente a <i>C. albicans</i>	49
3.20.7	Determinação dos resultados	50
3.21	Avaliação da atividade antibacteriana frente a <i>H. pylori</i>	50
3.21.1	Micro-organismo.....	50
3.21.2	Atividade antibacteriana	50
3.21.3	Preparo do inoculo.....	51
3.21.4	Determinação da CIM e CBM.....	51
3.21.5	Determinação dos resultados	52
3.22	Avaliação da associação de extratos e frações de <i>B. dracunculifolia</i> e do extrato de <i>P. elliottii</i> na atividade dos antimicrobianos de uso clínico	52
3.22.1	Procedimento experimental.....	53
3.23	Avaliação da Atividade Antimicobacteriana.....	54
3.23.1	Micro-organismos	54
3.23.2	Determinação da CIM.....	54
3.24	Avaliação da atividade Desinfetante Bactericida.....	55
3.24.1	Micro-organismos	55
3.24.2	Preparo dos cilindros carreadores.....	55
3.24.3	Preparo das culturas	56

3.24.4	<i>Procedimento experimental</i>	56
3.24.5	<i>Controles</i>	57
3.24.5.1	Contagem de bactérias viáveis nos cilindros carreadores	57
3.24.5.2	Viabilidade do meio de subcultura.....	58
3.24.5.3	Esterilidade do meio de subcultura	58
3.24.5.4	Esterilidade dos cilindros carreadores.....	58
3.24.5.5	Meios de cultura utilizados no experimento	59
3.25	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESINFETANTE FUNGICIDA	60
3.25.1	<i>Micro-organismo</i>	60
3.25.2	<i>Preparação da suspensão de conídios</i>	61
3.25.3	<i>Procedimento experimental</i>	61
3.25.4	<i>Controles</i>	62
3.25.4.1	Controle da suspensão conidial teste determinando a sua resistência ao fenol	62
3.25.4.2	Controle de viabilidade do meio de subcultura.....	62
3.25.4.3	Controle de esterilidade do meio de subcultura	62
3.25.4.4	Controle de esterilidade da água utilizada para o preparo das soluções de fenol	62
3.25.5	<i>Meios de cultura utilizados no experimento</i>	63
3.25.6	<i>Soluções utilizadas no experimento</i>	63
3.26	Avaliação da atividade micobactericida da solução hidroalcoólica do extrato de <i>B. dracunculifolia</i> a 0,2% em álcool 40 °GL	63
3.26.1	<i>Micro-organismos</i>	64
3.26.2	<i>Preparo dos cilindros carreadores</i>	64
3.26.3	<i>Preparo das culturas teste para o teste presuntivo</i>	64
3.26.4	<i>Avaliação da atividade micobatericida presuntiva</i>	65
3.26.5	<i>Preparo das culturas para o teste confirmatório</i>	65

3.26.6	<i>Avaliação da atividade micobatericida confirmatória</i>	65
3.27	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESINFETANTE ESPOROCIDA	66
3.27.1	<i>Micro-organismos</i>	66
3.27.2	<i>Preparação dos cilindros carreadores</i>	66
3.27.3	<i>Preparação das culturas teste</i>	67
3.27.3.1	<i>Clostridium sporogenes</i>	67
3.27.3.2	<i>Bacillus subtilis</i>	67
3.27.4	<i>Procedimentos experimentais realizados para cada micro-organismo</i>	68
3.27.5	<i>Controles</i>	68
3.27.5.1	Controle da cultura teste.....	68
3.27.5.2	Controles de esterilidade dos cilindros carreadores	69
3.27.5.3	Controle de esterilidade do meio de subcultura	69
3.27.6	<i>Meios de cultura utilizados</i>	69
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.1	FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE <i>B. dracunculifolia</i> EM HSCCC	72
4.2	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO BD-1	76
4.3	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO BD-2	78
4.4	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO BD-3	80
4.5	ISOLAMENTO EM CLAE-PREP DE COMPOSTOS DO EXTRATO DO LAVADO GLANDULAR DAS FOLHAS DE <i>B. dracunculifolia</i>	81
4.6	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA BdL-1	82
4.7	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA BdL-2	84
4.8	SUBSTÂNCIAS OBTIDAS A PARTIR DO PROCESSO DE RECRISTALIZAÇÃO	86
4.9	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA BdR-1	86
4.10	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA BdR- 2	89

4.11	DESCRIÇÃO DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE <i>P. elliotii</i>	92
4.12	ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE-UV-DAD E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS DE <i>P. elliotii</i> POR CLAE-PREP	93
4.13	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA Pe- 1.....	95
4.14	CONSIDERAÇÕES FITOQUÍMICAS	98
4.15	AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>B. dracunculifolia</i> PARA DETERMINAÇÃO DA CIM.....	99
4.16	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE <i>B. dracunculifolia</i> , FRAÇÕES, SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E PADRÕES COMERCIAIS	105
4.17	AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA DO EXTRATO DE <i>P. elliotii</i> E SUBSTÂNCIA ISOLADA, OBTIDO POR DETERMINAÇÃO DA CIM.....	108
4.18	AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>B. dracunculifolia</i> E DO EXTRATO DE <i>P. elliotii</i> A ANTIMICROBIANOS DE USO COMERCIAL.....	111
4.19	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DOS EXTRATOS DE <i>B. dracunculifolia</i> E <i>P. elliotii</i>	121
4.20	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESINFETANTE BACTERICIDA.....	122
4.21	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESINFETANTE FUNGICIDA.....	125
4.22	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DA SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA DO EXTRATO DE <i>B. dracunculifolia</i> A 0,2% EM ÁLCOOL A 40 °GL	126
4.23	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESINFETANTE ESPOROCIDA.....	127
5	CONCLUSÕES.....	130
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
7	APÊNDICE	151

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Historicamente Pasteur e Joubert estão entre os primeiros pesquisadores que verificaram a potencial utilização de produtos microbianos como agentes terapêuticos, quando em 1877 observaram e publicaram que alguns micro-organismos eram capazes de inibir o crescimento de bacilos antraz em urina.

O início da era moderna para o tratamento de infecções se dá com a introdução da sulfonamida na terapia clínica antimicrobiana, o uso clínico em 1941 da penicilina após a descoberta por Alexander Fleming em 1928 e o surgimento de novas classes de antimicrobianos após a segunda guerra mundial, marcaram a arrancada pela busca de novas substâncias antimicrobianas (GOODMAN & GILMAN, 2005).

Antibióticos estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo inteiro, porém sua eficácia clínica tem gerado sérias preocupações, especialmente devido ao aparecimento de bactérias resistentes (TAKAHASHI et al., 2008). O uso abusivo e incorreto desse tipo de agente quimioterápico acarreta em vários problemas tanto para a população que depende dos mesmos para o tratamento de várias enfermidades, quanto para os profissionais de saúde, que se vêm limitados frente ao desenfreado surgimento de micro-organismos resistentes.

Estudos recentes demonstram que já é possível encontrar em algumas regiões do mundo infecções bacterianas que se apresentam resistentes a todos os antibióticos disponíveis no mercado. Como exemplo comum pode-se destacar a resistência à vancomicina exibida primariamente por *Enterococcus* em 1988 e a transmissão de genes de resistência para outras espécies bacterianas, principalmente *Staphylococcus aureus* que já se apresenta resistente à meticilina, vancomicina e outros glicopeptídeos, antimicrobianos esses classificados entre os mais potentes e em muitos casos, últimas alternativas para o tratamento de processos infecciosos (NOBLE et al., 1992; COURVALIN, 2006; APPELBAUM, 2007; ANTHONY et al., 2009; HOWDEN et al., 2010; UDWADIA et al., 2011).

O contínuo surgimento de novas linhagens bacterianas resistentes acarreta na redução dos medicamentos disponíveis e a resistência bacteriana tem se tornado além de problema de saúde pública mundial, um grave problema econômico, visto que quando os antibióticos de primeira linha são ineficazes, faz-se necessário disponibilizar medicamentos de maior potência

e alto custo, além de poder ocasionar infecções prolongadas e aumento do risco de morte (ECDC/EMEA, 2009; WHO, 2014).

Como fator agravante a esse processo destaca-se a alta incidência do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) o que acarretou na reemergência de doenças infecciosas consideradas controladas até a última década, como a tuberculose. De acordo com a Organização Mundial de Saúde o bacilo causador da doença, *Mycobacterium tuberculosis*, tem se tornado resistente a tratamentos com isoniazida e rifampicina requerendo assim tratamentos longos e pouco efetivos, sendo que esse quadro piora a cada dia. Estima-se que só em 2012 surgiram 450.000 novos casos de pacientes contaminados por bacilos multirresistentes, no mundo todo. A associação entre a infecção pelo vírus HIV e o desenvolvimento de tuberculose por *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente é responsável pelo aumento de 50 a 80% dos índices de morte desses pacientes em um período relativamente curto de tempo, de quatro a dezesseis semanas (WELLS et al., 2007; WHO, 2014).

Vários são os fatores que contribuem para esse quadro, tais como: a utilização desenfreada de antimicrobianos; indicação errônea dos antibióticos e a disseminação, para o meio comunitário, de bactérias e fungos outrora presentes somente em ambientes hospitalares. A resistência a antimicrobianos não é mais um fato a ser enfrentado no futuro, pois o mundo vive hoje a era pós-antibiótico (WHO, 2014). Nesses casos, além da influência de antimicrobianos utilizados na prática clínica, temos também os desinfetantes e antissépticos hospitalares influenciando no processo para o surgimento de linhagens multirresistentes.

Estudos comprovam que a utilização em doses subefetivas de desinfetantes hospitalares está entre os importantes fatores para o desencadeamento de mutações em micro-organismos e o surgimento de linhagens resistentes aos antimicrobianos de uso clínico. Outros fatores que influenciam nesse processo são o manuseio incorreto dos desinfetantes em condições de temperatura e pH inadequados, e a não observância dos procedimentos corretos que devem ser executados previamente a exposição a esses produtos (HUET et al., 2008).

Desinfetantes são agentes comumente utilizados não somente em ambientes hospitalares, mas também em indústrias alimentícias e por fazendas que lidam com trato e coleta de material animal para o consumo humano, bem como em ambientes domésticos. Em todos esses ambientes já é possível observar o surgimento de bactérias causadoras de infecções alimentares graves, que se apresentam resistentes a concentrações usuais de hipoclorito de

sódio, um desinfetante amplamente utilizado tanto em ambientes de saúde e produção alimentícia como também pela população (MACHADO et al., 2010).

Outro fator alarmante é a disseminação para o ambiente comunitário de micro-organismos presentes em ambiente hospitalar e que se apresentam resistentes a vários desinfetantes de uso hospitalar. Esse tipo de disseminação se dá através dos efluentes descartados desses estabelecimentos de saúde. A identificação desses micro-organismos indicou se tratarem de *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp, e *Bacillus* spp, micro-organismos esses, estreitamente relacionados a infecções oportunistas em ambientes hospitalares. Estudos dessa natureza são de grande importância para o entendimento da evolução do processo de resistência aos desinfetantes e a verificação do impacto direto sobre a população, visto que esses micro-organismos são disseminados para o ambiente comunitário sem nenhum controle (NUÑES & MORETTON, 2007).

Frente aos alarmantes índices de resistência que vem sendo apresentados pelos micro-organismos, tanto ao uso dos antimicrobianos na prática clínica, quanto aos desinfetantes disponíveis no mercado, são necessárias medidas emergenciais de conscientização junto à população e profissionais de saúde, bem como novas abordagens de órgãos regulatórios, indústrias e instituições de pesquisa na busca de soluções que possam desacelerar esse processo. Além de toda pressão pelo desenvolvimento de novos produtos com ação antimicrobiana, não se encontra hoje no mercado um desinfetante que atenda a todas as necessidades impostas pela demanda. Assim, se faz necessário a busca de novas substâncias com atividade antimicrobiana para possibilitar o desenvolvimento de novos fármacos e novos agentes de sanitização que apresentem baixo custo, alta eficácia e baixa toxicidade (WHO, 2014; TEIXEIRA et al., 2012).

1.2 PRODUTOS NATURAIS

O relato da utilização de produtos naturais pela humanidade ocorre desde épocas bem remotas. A busca por alívio de sintomas e cura de doenças pela ingestão de plantas apresenta-se como uma das primeiras formas de utilização de produtos naturais para fins medicinais (VIEGAS Jr et al., 2006).

A investigação farmacológica de princípios ativos de plantas medicinais tem proporcionado importantes avanços na abordagem terapêutica de várias patologias, sendo que várias substâncias oriundas de plantas têm sido utilizadas como ferramentas úteis em estudos farmacológicos, fisiológicos e bioquímicos (SOUZA BRITO, 1996; RATES, 2001).

Newman (2008) e Newman e Cragg (2012) publicaram artigo de revisão sobre a utilização de produtos naturais no desenvolvimento de novos fármacos para diversos tipos de terapias. O estudo demonstrou que em mais de seis décadas de busca de substâncias para o tratamento de câncer, nos depósitos de patentes de novos fármacos, 47% correspondiam a compostos oriundos de produtos naturais ou derivados dos mesmos. Destaca-se, ainda, a contribuição dos produtos naturais para o desenvolvimento de novos antimicrobianos, bem como para outras áreas, nas quais os produtos naturais são utilizados como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, por meio da utilização de técnicas de recombinações e rearranjos químicos (NEWMAN, 2008; CRAGG & NEWMAN, 2013).

1.3 GÊNERO *Baccharis*

O gênero *Baccharis* é considerado o maior gênero da família Asteraceae, apresentando cerca de 500 espécies distribuídas pelo continente americano. Muitas espécies que compõem esse gênero são utilizadas pela população, nas formas de chás e infusos, para o tratamento de vários tipos de enfermidades, dentre elas males do estômago, fígado, anemias, inflamações, diabetes e são descritas como espécies com ação desintoxicante sobre o organismo (ABAD & BERMEJO, 2007).

Baseando-se nos relatos da utilização pela população de espécies do gênero *Baccharis*, vários grupos de pesquisa vêm desenvolvendo estudos com plantas desse gênero na busca de medicamentos com atividade anti-inflamatória, antiparasitária, inseticida, gastroprotetora e antimicrobiana, entre outras. Quimicamente o gênero é caracterizado por possuir substâncias das classes dos diterpenos, dos tipos clerodano e labdano, além de flavonóides e fenilpropanóides. Quanto aos principais metabólitos, os diterpenos dos tipos clerodano e labdano, encontrados principalmente nas raízes das espécies do gênero *Baccharis* apresentam atividades biológicas variadas, tais como antitumoral e tripanocida. Já os flavonóides possuem inúmeras atividades, como antioxidante, anti-inflamatória, antiprotozoária e antimicrobiana (BOHLMANN et al., 1985; MOREIRA et al., 2003; VERDI et al., 2005; GRECCO et al., 2014).

Várias espécies do gênero possuem tricomas tectores e glandulares na superfície de suas folhas. Essas estruturas têm a função de atuarem como barreiras frente a ataques de herbívoros. Os tricomas glandulares são de grande importância química, pois neles se acumulam metabólitos secundários de interesse para estudos químicos e biológicos. Dentre os

constituintes do conteúdo dos tricomas glandulares de plantas da tribo Astereae podemos destacar os terpenoides, flavonoides e derivados do ácido cumárico (HELLWIG, 1992; SPRING, 2000).

Dentre as várias atividades conferidas às espécies do gênero podem-se destacar vários estudos realizados para determinar as atividades antibacterianas e antifúngicas dos extratos das folhas e dos óleos essenciais extraídos das espécies desse gênero.

O óleo essencial extraído da espécie *Baccharis grisebachii* apresentou-se ativo frente aos fungos *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp.* e principalmente frente aos dermatófitos *Tricophyton mentagrophytes* e *Tricophyton rubrum*, bem como frente a *Staphylococcus aureus* resistente e sensível a meticilina. Atividade antifúngica também foi conferida ao óleo essencial extraído de *Baccharis latifolia*, o qual foi ativo frente a *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* (FERESIN et al., 2001; HADAD et al., 2007; VALAREZO et al., 2013).

Estudos utilizando extratos das folhas e óleos essenciais extraídos de *Baccharis unicella* e *Baccharis semiserrata* demonstraram que o óleo essencial de *B. unicella* apresentou atividade antifúngica frente a *Microsporum gypseum*, *T. mentagrophytes*, *C. neoformans* e *Microsporum canis*. Já o óleo essencial de *B. semiserrata* apresentou atividade moderada frente a *S. aureus* e o extrato das folhas apresentou atividade frente a *S. aureus* e *Bacillus cereus*, bem como ambos foram ativos frente aos fungos *M. gypseum*, *C. albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *T. mentagrophytes*, *C. neoformans* e *T. rubrum* (VANNINI et al., 2012).

O óleo essencial de *Baccharis articulate* oriunda do Rio Grande do Sul, foi avaliado frente a sete diferentes micro-organismos, sendo ativo frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas. Atividade antibacteriana também foi observada para os óleos essenciais e extratos metanólicos das folhas de *Baccharis magellanica* e *Baccharis oleoides* frente a bactéria *S. aureus* (SIMONSEN et al., 2009; SIMIONATTO et al., 2008).

Em análises realizadas pelo método de difusão em ágar observou-se que o óleo essencial extraído de *Baccharis trinervis* possui atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *E. coli*, *S. choleraesuis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. O óleo essencial da espécie *Baccharis unicella* também foi ativo frente às bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, bem como o óleo essencial extraído das partes aéreas de *Baccharis notoserghila* foi ativo frente às bactérias Gram positivas e Gram negativas (COBOS et al., 2001; ALBUQUERQUE et al., 2004; FERRONATTO et al., 2007).

Rahalison e colaboradores (1995) verificaram a atividade do extrato de *Baccharis pedunculata* frente a fungos patogênicos e fitopatogênicos, determinando ainda que as substâncias responsáveis por tal atividade foram um derivado prenilado do ácido cumárico, uma lactona acetilênica e uma flavona, todos isolados a partir do extrato diclorometanólico das folhas da espécie.

O extrato em éter de petróleo das folhas de *Baccharis darwinii* apresentou atividades frente a *C. neoformans* e fungos dermatófitos, bem como as substâncias anisocoumarin H, aurapten e diversinin, todas isoladas a partir do extrato da espécie (KURDELAS et al., 2010).

Zampini e colaboradores (2009a) verificaram a atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na alimentação da população do altiplano argentino. Dentre as espécies utilizadas pela população verificou-se a utilização de *Baccharis boliviensis* na forma de decocto e tintura, e o estudo comprovou sua atividade frente a várias linhagens bacterianas sensíveis e multirresistentes isoladas de pacientes que apresentaram infecções oportunistas.

Extratos polares de *Baccharis incarum* foram avaliados frente a *S. aureus* e *E. faecalis*, tendo apresentado atividade antimicrobiana frente as duas espécies. Além do estudo realizado com os extratos, foram avaliadas substâncias isoladas da fração polar dos mesmos e os resultados demonstraram que sete flavonas isoladas foram capazes de inibir o crescimento dos micro-organismos testados (ZAMPINI et al., 2009b). A tintura obtida a partir de *Baccharis incarum* também foi ativa frente a *S. aureus* resistente a meticilina e a *E. faecalis* quando associada a preparação de uso tópico no tratamento de infecções de pele por estes micro-organismos (NUÑO et al., 2012).

A partir de estudo biodirecionado utilizando-se o extrato dos ramos de *Baccharis retusa* foi possível isolar a flavanona 5,4'-diidroxí-7-metoxiflavanona, a qual foi conferido alto potencial antifúngico frente aos fungos patogênicos dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Saccharomyces* (GRECCO et al., 2014).

Baccharis microphylla, *Baccharis petiolata* e *Baccharis santeliciis* também foram avaliadas para determinação da atividade antibacteriana e antifúngica de seus extratos hidroalcoólico e clorofórmico, os quais apresentaram atividade frente as bactérias avaliadas, principalmente as Gram positivas (MORALES et al., 2008).

O extrato metanólico da espécie *Baccharis glutinosa* apresentou-se capaz de inibir a germinação de esporos e o crescimento de hifas de fungos dos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus*,

desencadeando grandes modificações morfológicas nas células fúngicas (ROSAS-BURGOS et al., 2011).

Foi conferido ao extrato de *Baccharis trimera* atividade bacteriostática frente a bactérias Gram positivas de grande importância médica (ALEIXO, 2013). Outro estudo relata ainda a atividade dos extratos etanólicos de *B. trimera* e *B. articulata* frente a *Helicobacter pilory*, bactéria Gram-negativa, microaerófila, estreitamente associada às úlceras pépticas e duodenais ou gástricas e um fator de risco para o desenvolvimento de adenocarcinomas gástricos (TASCETTO, 2010). Avancini e colaboradores (2000) determinaram a atividade antimicrobiana do decocto de *Baccharis trimera* e demonstraram que o mesmo possui potencial para ser utilizado como desinfetante e antisséptico em algumas situações que envolvem infecções recorrentes por microrganismos patogênicos na produção animal.

Com base em todos os resultados relatados verifica-se a relevância em se estudar as atividades antimicrobianas de espécies do gênero *Baccharis*. Uma espécie muito estudada no Brasil é *Baccharis dracunculifolia*, que além de ser a fonte botânica da própolis verde, a qual já foram conferidas várias atividades terapêuticas, apresenta grande potencial gastroprotetor e antimicrobiano.

1.4 *Baccharis dracunculifolia*

Baccharis dracunculifolia DC (Asteraceae) (Figura 1), conhecida popularmente como “alecrim do campo”, “vassourinha” ou “vassoura” é um arbusto lenhoso, nativo das regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, principalmente nas áreas de cerrado, pastagens abandonadas e áreas em processo de sucessão (FERRACINI et al., 1995 BASTOS, 2001).

A epiderme foliar de *B. dracunculifolia* possui tricomas agrupados e distribuídos regularmente pelo limbo, sendo que seus ápices foliares apresentam grande quantidade de tricomas glandulares (BARROSO, 1976). O grande número desses tricomas proporciona grande quantidade de secreção do tipo resinoso, de composição variada (CASTRO, 1987).

Dentre os principais metabólitos secundários já identificados na espécie podem-se destacar terpenoides, flavonoides e compostos fenólicos prenilados derivados de ácido cumárico (VERDI et al., 2005).



Figura 1. Fotos da coleta e secagem das partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia*.

B. dracunculifolia é uma espécie muito utilizada na medicina popular como agente anti-inflamatório e no tratamento de doenças gastrointestinais. Estudos avaliaram a atividade anti-ulcerogênica do óleo essencial de *B. dracunculifolia* e os resultados demonstraram que o mesmo foi capaz de reduzir a área total das lesões ulcerativas estomacais, bem como a quantidade de lesões, quando comparado aos controles tanto do grupo positivo quanto negativo, além de reduzir o volume de suco gástrico secretado promovendo o aumento do pH gástrico (MASSIGNANI et al., 2009).

O óleo essencial de *B. dracunculifolia* é composto principalmente por mono e sesquiterpenos dentre eles destaca-se como componente majoritário o nerolidol, que também apresentou resultados positivos frente a vários modelos de úlcera induzida em ratos, corroborando assim na indicação da utilização do óleo essencial de *B. dracunculifolia* frente aos processos ulcerativos estomacais (KLOPELL et al., 2007; QUEIROGA et al., 1990).

Outro estudo relacionando a utilização de *B. dracunculifolia* para tratamento de disfunções gástricas foi realizado por Lemos e colaboradores (2007), o qual demonstrou atividade gastroprotetora do extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* sobre a mucosa gástrica de animais que sofreram a indução de formação de úlceras estomacais. Estudos realizados com outras espécies do gênero *Baccharis* para avaliação da atividade anti-ulcerogênica indicam que seu potencial anti-inflamatório está estreitamente relacionado a atividade anti-ulcerogênica apresentada (VIDARI et al., 2003).

Na literatura também encontramos relatos de atividades antibacterianas e antifúngicas conferidas à espécie. Johann e colaboradores (2012) demonstraram a atividade da fração hexânica e de substâncias isoladas de *B. dracunculifolia* frente a quatro linhagens de *Paracoccidioides brasiliensis* isoladas. Os compostos, metil linolenato, óxido de cariofileno e trans nerolidol isolados a partir de *B. dracunculifolia* apresentaram-se ativos frente a quatro linhagens de *P. brasiliensis*. Avaliou-se também a interferência da adição de ergosterol aos meios de cultura o que levou a alterações nos valores da concentração inibitória mínima (CIM) indicando que as substâncias interagem com esse componente da membrana celular fúngica, afetando assim o crescimento do micro-organismo. O extrato metanólico das folhas de *B. dracunculifolia* também apresentou atividade antibacteriana frente a *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *C. neoformans* (FABRI et al., 2011).

Gelinski e colaboradores (2007) também avaliaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de *B. dracunculifolia*, bem como de seu composto majoritário, o nerolidol. O estudo demonstrou que o óleo essencial de *B. dracunculifolia* apresentou-se ativo frente às bactérias patogênicas *Proteus sp*, *Staphylococcus sp*, *E. coli* e *L. monocytogenes*. O nerolidol também apresentou atividade antibacteriana frente à *Staphylococcus sp* e *L. monocytogenes*.

O óleo essencial de *B. dracunculifolia* apresentou atividade antifúngica frente a linhagens de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças em amamentação e de suas mães, com resultados melhores do que os antibióticos anfotericina B e fluconazol inclusive frente as linhagens que se apresentaram resistentes aos antimicrobianos padrões. O óleo apresentou-se ativo também frente as bactérias patogênicas *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (PEREIRA et al., 2011; FERRONATTO et al., 2007).

Duarte e colaboradores (2004) realizaram estudo com extratos hidroalcoólicos de várias espécies, dentre elas *B. dracunculifolia*, demonstrando que o extrato da espécie em questão apresentou-se ativo frente à *Streptococcus faecium*.

B. dracunculifolia é reconhecidamente a principal fonte botânica da própolis verde brasileira e vários estudos conferem a própolis várias atividades, dentre elas a ação antimicrobiana. Estudos determinaram inclusive uma estreita correlação entre as substâncias majoritárias encontradas na própolis e nos extratos de *B. dracunculifolia* tendo como principal marcador dessa semelhança a substância artepelin C. Assim, alguns estudos foram conduzidos para verificar se as atividades apresentadas pela própolis verde também são apresentadas pela espécie vegetal (PARK et al., 2004; KUMAZAWA et al., 2003).

Leitão e colaboradores (2004) demonstraram que os extratos de *B. dracunculifolia* e de própolis verde se apresentaram ativos frente a bactérias cariogênicas, inclusive com os mesmos valores de CIM. Outro estudo comparativo foi conduzido por Silva Filho e colaboradores (2008), os quais verificaram que tanto o extrato de *B. dracunculifolia* quanto o extrato de própolis verde se apresentaram ativos frente a fungos patogênicos, porém com melhores resultados observados para o extrato de própolis.

De forma semelhante foram relatadas atividades antimicrobianas dos extratos hidroalcoólicos de *B. dracunculifolia* e própolis verde, comprovando que ambos apresentaram-se ativos frente às bactérias encontradas no rúmen de bovinos, com melhores resultados para os extratos de própolis, demonstrando ainda que quanto maior a quantidade de compostos fenólicos presentes no extrato maior foi a atividade antimicrobiana observada (AGUIAR et al., 2013).

Banskota e colaboradores (2001) demonstraram ainda, que a própolis verde apresentou atividade antibacteriana frente a *H. pilory*, bem como um diterpeno labdano e alguns compostos fenólicos prenilados isolados a partir da mesma.

Assim, todas as atividades relacionadas tanto a *B. dracunculifolia* quanto à própolis verde evidenciam o potencial de *B. dracunculifolia* para utilização em produtos com atividade antimicrobiana.

1.5 O GÊNERO *Pinus* E A ESPÉCIE *Pinus elliottii*

As plantas do gênero *Pinus* são originárias do hemisfério norte e muito conhecidas por sua capacidade invasora e proliferativa. Vários são os relatos de espalhamento dessa espécie por países do mundo todo, inclusive no hemisfério sul. O cultivo de espécies de *Pinus* spp foi introduzido no Brasil como tentativa de reflorestamento e, por serem espécies exóticas com crescimento rápido, foram implantadas para suprir a necessidade de produção de madeira e energia (REJMANEK & RICHARDSON, 1996; RICHARDSON & HIGGINS, 1998; MAJER & RECHER, 1999).

As pinhas, folhas, casca e resina de espécies do gênero são historicamente utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de reumatismo, problemas respiratórios e como antissépticos de uso geral (LEUNG & FOSTER, 1996).

Dentre os compostos majoritários presentes nas espécies do gênero podem-se destacar os compostos fenólicos e terpenoides. Alguns insetos utilizam resinas de plantas desse gênero em sua alimentação para se protegerem de infecções bacterianas e fúngicas, conseguindo assim aumentar a viabilidade de suas larvas e a sobrevivência de insetos adultos (CHAPUISAT et al., 2007).

Pinus elliottii Engelm (Figura 2) é uma espécie da família Pinaceae nativa do sudeste dos Estados Unidos e se tornou uma espécie amplamente cultivada em plantações subtropicais do Brasil, Índia e China, muito utilizada na produção de resina e indústria moveleira (LANGENHEIM, 2003).



Figura 2. Fotos da coleta de resina da espécie *Pinus elliottii*.

A espécie *Pinus elliotti* foi introduzida no sudeste brasileiro, em meados da década de 50, como espécie de reflorestamento e para produção de celulose. Por ser uma espécie de alta capacidade invasiva ocupou áreas de preservação ambiental (BECHARA, 2003).

O Brasil é o país que possui a maior área cultivada da espécie *Pinus elliottii*, e encontra-se hoje em segundo lugar na produção de resina mundial ao lado da Indonésia, abaixo somente da China. Estima-se que a safra referente aos anos de 2013/2014 será de cerca de 94 toneladas de resina, que serão totalmente consumidas pelo mercado mundial. A óleo-resina produzida pelos pinheiros é essencialmente uma resposta de defesa da árvore, uma das primeiras formas de se defender de insetos e fungos fitopatogênicos (ARES B, 2014; TRAPP & CROTEAU, 2001; PHILLIPS & CROTEAU, 1999).

A resina produzida por pinheiros é composta de terebintina, que é a fração volátil composta por mono e sesquiterpenos e pela colofônia ou breu que é a fração não volátil, composta principalmente por diterpenos. Para a espécie *P. elliottii* a fração volátil é composta principalmente por α e β pinenos e a colofônia tem como componentes majoritários diterpenos derivados dos ácidos abiético e pimárico (PHILLIPS & CROTEAU, 1999; MARTIN et al., 2002; MARTIN et al., 2003; LANGENHEIM, 2003).

A partir da fração volátil da resina de pinheiros é sintetizado o óleo de pinho, reconhecido por suas atividades antimicrobianas e suas características olfativas, o qual é muito empregado em formulações desinfetantes com ação biocida. O óleo de pinho é composto por uma grande variedade de terpenos sendo o α -terpineol, produto originário da reação de hidratação do α - pineno, o componente responsável por sua ação biocida (CASTANHEIRO et al., 2003; LIU et al., 2008).

Vários estudos conferem atividade antimicrobiana tanto à fração volátil quanto à fração fixa da resina de espécies de *Pinus* sp., bem como as frações voláteis e extratos de várias partes das plantas desse gênero.

Os óleos essenciais de *P. densiflora* apresentaram grande atividade antimicrobiana frente a bactérias GRAM negativas e GRAM positivas, enquanto o óleo de *P. koraiensis* apresentou atividade antifúngica (BOLISHACOVA et al., 1988; EUI-JU et al., 2004).

Estudos realizados com *Pinus nigra* possibilitaram o isolamento de um ácido diterpênico, o ácido isopimárico, que apresentou grande atividade antibacteriana frente a linhagens de *S. aureus* multirresistentes e resistentes a meticilina (SMITH et al. 2005). Nagnom & Clement (1990) identificaram componentes terpênicos da espécie *P. pinaster*, os quais apresentaram grande toxicidade frente ectoparasitas de plantas. O óleo volátil e extratos obtidos a partir de várias partes da espécie *Pinus pinaster*, demonstraram que o óleo extraído a partir das agulhas foi efetivo contra a bactéria *Streptococcus* sp. (BERNARDI et al., 2009).

Extratos obtidos a partir das folhas, resina e cones de *P. brutia*, preparados utilizando-se metanol, acetona e clorofórmio foram ativos frente várias bactérias relacionadas a patologias humanas, bactérias do gênero *Bacillus* sp., e linhagens de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *S. aureus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Proteus vulgaris*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* (DIGRAK et al., 1999).

Às várias espécies de *Pinus* também foram conferidas atividade antifúngica de seus óleos e extratos. O óleo essencial extraído de *P. densiflora* apresentou atividade antifúngica frente à *C. neoformans* e *C. glabrata*, os quais estão relacionados a infecções humanas. A partir do extrato metanólico dos cones dessa mesma espécie foi isolado um diterpeno labdano muito ativo frente a uma das bactérias causadores da acne, a *Propionibacterium acnes* (LEE et al., 2009; SULTAN et al., 2008).

Algumas atividades já foram conferidas às partes aéreas, resina e substâncias isoladas a partir de *P. elliottii*. Dentre elas pode-se citar o estudo realizado por Tóro e colaboradores (2003) que conferiu atividade anti-helmíntica a resina de *P. elliottii* sobre uma espécie de parasita encontrado em peixes. Além da resina total avaliou-se também a fração volátil da mesma, sua fração fixa e a atividade dos componentes majoritários da fração volátil da resina, os monoterpenos α e β pineno, os quais foram ativos, porém menos efetivos que a resina bruta e suas frações. A óleo-resina extraída de *P. elliottii* apresentou ótimo resultado na inibição do crescimento das bactérias anaeróbias estritamente relacionadas a problemas periodontais, endodônticos, infecções bucais e desenvolvimento de cáries. Outros estudos conferiram ainda atividade antibacteriana a espécie frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas multirresistentes (CARDOSO et al., 2011; SILVA et al., 2011; INÁCIO et al., 2011).

Aos ácidos abietanos encontrados na resina de *P. elliottii* e outras espécies de *Pinus* sp., bem como derivados obtidos dos mesmos através de reações de semi-síntese, foram conferidas atividades antimicrobianas, gastroprotetoras, cardiovasculares, antialérgicas e surfactantes (SAN FELICIANO et al., 1993; SEPÚLVEDA et al., 2005).

Diterpenos derivados de esqueleto abietano, isolados a partir da espécie *Chamaecyparis pisifera* apresentaram atividade antimicrobiana frente as bactérias GRAM positivas *S. aureus* e *Bacillus subtilis* (XIAO et al.; 2001).

Os diterpenos ácidos abiético, deidroabiético e neoabiético são destacados como os responsáveis pela atividade antibacteriana da mistura de diterpenos ácidos presentes na resina de *Pinus*. Outros estudos conferem ao ácido deidroabiético, ácido pisiférico e outro ácido derivado abietano as atividades antifúngicas conferidas à resina (SÖDERBERG et al., 1990; SÖDERBERG et al., 1991).

González e colaboradores (2010) realizaram várias alterações químicas em diterpenos derivados do ácido abiético e avaliaram suas atividades antifúngica e antiviral. Comprovaram que a introdução de grupamento aldeído na posição 18 levou a melhora das atividades

observadas para o ácido abiético, enquanto a presença de grupamentos ácido ou hidroxílico ocasionaram a redução da atividade observada.

Devido as várias atividades observadas tanto para a resina total de *P. elliotii* quanto para a fração fixa da resina, onde se encontram os diterpenos ácidos derivados de esqueleto pimarano e abietano, a resina dessa espécie é um alvo para estudos que possibilitem sua utilização em produtos com atividade antimicrobiana, bem como sua associação em produtos com atividade desinfetante.

1.6 NOVAS ABORDAGENS FRENTE A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A partir da década de 70 houve grande redução na investigação por novos produtos antibióticos. Isso ocorreu a partir da mudança de foco dentro das instituições de pesquisa e indústrias, nas quais passou-se a priorizar a modificação de classe de medicamentos já existentes em detrimento ao desenvolvimento de novos produtos, principalmente por razões financeiras, o que veio a acarretar em uma defasagem frente ao tratamento de processos infecciosos (ECDC / EMEA, 2009; NORDBERG et al., 2005).

Frente a todas as dificuldades nos tratamentos de infecções, em 2011, estudos acadêmicos e da indústria possibilitaram a elaboração de uma lista de possíveis abordagens para solucionar essa crise de resistência aos antimicrobianos. Dentre as potenciais estratégias a serem empregadas podemos destacar o desenvolvimento de substâncias alternativas aos antibióticos e a descoberta ou desenvolvimento de novos adjuvantes terapêuticos (BUSH et al., 2011).

Estudos fitoquímicos em busca de princípios bioativos apresentam-se como uma promessa de novos adjuvantes no tratamento de infecções. Levantamento realizado por Hemaishwarya et al. (2008) descreveu com detalhes o efeito sinérgico da associação de metabólitos secundários vegetais, entre si e com fármacos sintéticos, no combate a infecções bacterianas, fúngicas e por micobactérias, demonstrando inclusive que o mecanismo de ação da combinação difere significativamente do que se observa quando se utiliza os mesmos princípios individualmente.

Sobre a utilização de adjuvantes, uma possibilidade é a associação de antibióticos com substâncias que não apresentam essa atividade. Alguns estudos *in vitro* comprovaram que a associação com anti-psicóticos e anti-inflamatórios promoveu melhora na eficácia de

antibiótico. Outra possibilidade é a associação de antibióticos disponíveis no mercado com compostos naturais bioativos. Produtos fitoquímicos podem representar adjuvantes promissores tanto associados entre si, na forma de extratos ou como óleos essenciais extraídos de espécies vegetais quando associados com antibióticos de alta potência disponíveis no mercado (BUSH et al., 2011; EJIM et al., 2011; MAZUMDAR, 2009; AL-BAYATI, 2008; LEHTINEN, 2007; SAKAGAMI, 2005).

Além de vários estudos utilizando óleos essenciais, avaliações de extratos vegetais de espécies de vários gêneros em associação a antimicrobianos no tratamento de infecções também são relatados na literatura, como é o caso do estudo realizado por Betoni e colaboradores (2006) que avaliou a utilização de extratos de *Mikania glomerata*, *Psidium guajava*, *Syzygium aromaticum*, *Allium sativum*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale*, *Baccharis trimera* e *Mentha piperita* associados a vários antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus*, comprovando eficácia antimicrobiana para todas as associações.

A associação do extrato de *Mangifera indica* L com os antimicrobianos tetraciclina e eritromicina levou a redução em quatro vezes dos valores de MIC para esses antimicrobianos frente a linhagens de *S. aureus*, quando comparado aos valores de MIC sem a associação (SOUTO de OLIVEIRA et al., 2011). A associação de extratos das espécies *Rosmarinus officinalis*, *Coriandrum sativum*, *Micromeria fruticosa* L., *Cuminum cyminum* e *Mentha piperita*, com os antimicrobianos gentamicina, cefalotina e ceftriaxona demonstraram uma redução da resistência a esses antimicrobianos frente a 13 diferentes linhagens de micro-organismos (TOROGLU, 2011).

Como outro exemplo da utilização de produtos naturais associados a antimicrobianos de uso clínico podemos citar o estudo realizado utilizando-se frações polares e apolares do extrato das folhas de *Baccharis coridifolia* que demonstrou interação positiva de ambas frações quando associadas aos antimicrobianos avaliados, frente a *S. aureus* e *E. coli*, ressaltando-se que em nenhum caso observou-se interação negativa entre os mesmos (ONOFRE et al., 2013).

Estudo realizado por Rodriguez e colaboradores (2013) analisou os extratos de nove espécies do gênero *Baccharis* originárias da Argentina, em associação a terbinafina frente ao fungo dermatófito *T. mentagrophytes*. Os resultados demonstraram que 10 dos 44 extratos avaliados apresentaram atividade sinérgica ou aditiva à ação da terbinafina frente ao fungo dermatófito. Analisando-se ainda substâncias isoladas a partir dos extratos demonstrou-se que as substâncias bacchotricuneatina A e a bacrispina apresentaram atividade sinérgica e o ácido

hawtrivaico apresentou efeito aditivo. Estudos comprovaram também que a associação de triterpenos pentacíclicos com os antimicrobianos de uso clínico vancomicina e meticilina potencializou a ação dos mesmos, frente às linhagens de *S. aureus* sensíveis e resistentes (CHUNG et al., 2011).

A combinação de produtos naturais entre si se apresenta como mais uma promissora vertente nessa nova abordagem. Alguns relatos já apresentam associações positivas entre vários derivados de produtos naturais com bons resultados frente a micro-organismos.

A combinação entre carvacol e cinamaldeído apresentou-se como uma promessa para o desenvolvimento de um produto com atividade conservante alimentícia, bem como a combinação de mel com cúrcuma, que quando combinados apresentaram efeito antimicrobiano sinérgico frente a bactérias patogênicas (YE et al., 2013; AHMED et al., 2013).

Outro exemplo da associação positiva é o estudo realizado por Probst e colaboradores (2011) que determinou a atividade antimicrobiana da própolis produzida por *Apis mellifera* e óleos essenciais de plantas aromáticas utilizadas na culinária popular, individualmente e associadas entre si. Os resultados demonstraram que a combinação de extratos etanólicos de própolis com óleos essenciais de gengibre e menta, bem como a associação de óleos de canela com gengibre ou alho, apresentaram efeito sinérgico quando avaliados frente as linhagens de *S. aureus* e *E. coli*, isoladas de pacientes.

Al-Bayati (2008) avaliou a atividade dos óleos e extratos metanólicos das partes aéreas de *Thymus vulgaris* e sementes de *Pimpinella anisum* frente a várias linhagens bacterianas com resultados positivos para os extratos e óleos frente a algumas bactérias, e demonstrou ainda que quando se associaram os óleos e os extratos metanólicos das duas espécies foi possível observar uma ação aditiva para os mesmos, principalmente frente a bactéria *P. aeruginosa*.

Dentre os estudos citados, em alguns casos, as atividades observadas para os produtos naturais isoladamente não eram promissoras, porém quando associados aos antimicrobianos ou entre si verificou-se uma melhora significativa dos efeitos antimicrobianos.

1.7 SANITIZANTES, DESINFETANTES, ANTISSEPTICOS E ESTERILIZANTES

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), define-se que sanitizantes são produtos que promovem a redução da contaminação bacteriana a níveis seguros de acordo com as normas de saúde e desinfetantes, como produtos que matam todos os micro-organismos patogênicos, mas não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas em objetos e superfícies inanimadas. Os antissépticos são produtos para utilização em tecidos vivos e os esterilizantes são produtos que apresentam efeito letal sobre micro-organismos esporulados (ANVISA, RDC 14/2007; ANVISA, portaria 15/1988).

No Brasil, a portaria da Divisão Nacional de Saneantes Domissanitários (DISAD) nº15, de 23 de agosto de 1988 foi a primeira a definir a descrição do procedimento para o registro de agentes químicos como desinfetantes hospitalares junto a ANVISA, definindo ainda quais eram as exigências para o registro de produtos de acordo com o uso para o qual se destinavam, através da comprovação da eficácia frente a vários micro-organismos, inclusive micobactérias.

Dentre a classificação dos desinfetantes, esses são divididos em desinfetantes de uso geral, os quais são destinados ao uso doméstico, bem como ambientes públicos e privados. O segundo grupo são os desinfetantes de uso hospitalar, os quais foram divididos em:

A) Desinfetantes para superfícies fixas e artigos não críticos, destinados a utilização em paredes, pisos e mobiliários, vetando-se o uso de compostos derivados fenólicos para tal fim. Para o registro desses produtos se faz necessária a comprovação da eliminação da contaminação pelos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*. B) Desinfetantes hospitalares para uso em artigos semi-críticos, se tratam de produtos para uso hospitalar e em estabelecimentos relacionados a atendimento à saúde e, para que pudessem ser registrados como tais, devem eliminar as contaminações já citadas para os artigos não críticos e eliminar ainda a contaminação por *Tricophyton mentagrophytes*, *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobaterium bovis*. C) Os esterilizantes, sã determinados como produtos capazes de eliminar contaminações por micro-organismos esporulados e de uso exclusivo em hospitais e estabelecimentos relacionados a atendimento à saúde, como alternativas em casos de materiais que não possam ser esterilizados com a utilização de luz e calor. Para seu registo esses produtos devem eliminar também a contaminação por esporos das bactérias *Bacillus subtilis* e *Clostridium sporogenes*. (ANVISA, portaria 15/1988)

A partir de 2007 devido a vários surtos de infecções por bactérias antes não preconizadas nos testes para registo de produtos desinfetantes determinou-se uma divisão entre os artigos de uso em saúde definindo-se como artigos não críticos os objetos e equipamentos odontológicos,

médicos e hospitalares que entram em contato superficial com a pele intacta dos pacientes; artigos semi-críticos os objetos que entram em contato com a pele não íntegra e a mucosa de pacientes e artigos críticos como objetos utilizados em procedimentos invasivos e de alto risco que penetram tecidos ou órgãos. (ANVISA, RDC 14/2007)

A partir de 16 de agosto de 2010, por meio das Resoluções da Diretoria Colegiada nº 33 e nº 35, a ANVISA promoveu modificação nos termos destinados a cada tipo de desinfetante e a abrangência de cada um deles, bem como os micro-organismos os quais devem ser efetivos. Proibiu-se, ainda, o registro de novos produtos saneantes na classe de esterilizantes para a aplicação sob forma de imersão, permitindo-se somente a utilização de calor seco, calor úmido e radiações.

De acordo com a nova classificação, os desinfetantes de uso hospitalar passaram a ser divididos em:

A) Desinfetantes de nível intermediário, para a utilização em superfícies fixas e em artigos não críticos, sendo que esses produtos devem ser ativos frente aos micro-organismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*, *E. coli*, *C. albicans*, *T. mentagrophytes*, *M. smegmatis* e *M. bovis*. B) Desinfetantes de alto nível para serem utilizados sobre artigos semi-críticos. Para o registro esses devem também ser capazes de eliminar a contaminação por *Mycobacterium massiliense*, *B. subtilis* e *C. sporogenes* (ANVISA, RDC 35/2010)

Mesmo com o frequente acompanhamento pela agência reguladora e pelas comissões residentes em ambientes hospitalares, a velocidade de adaptação dos micro-organismos ainda é superior ao desenvolvimento e regulamentação de novos produtos saneantes. Aliado a isso não existe hoje no mercado nenhum produto com ação desinfetante que consiga abranger de forma eficaz todos os micro-organismos responsáveis pelos surtos infecciosos, fazendo-se necessário rodízio e associações de produtos na tentativa de conter as disseminações. (RDC 210/ANVISA 2003).

Além dos desinfetantes, outros produtos são utilizados durante o processo de limpeza e desinfecção. Encontram-se no mercado produtos detergentes os quais têm a função de exercer a remoção de gorduras e sujidades e assim auxiliar no processo de desinfecção, tanto em ambientes comunitários como de saúde. Mas estudos verificaram que em alguns casos os agentes utilizados no processo inicial de limpeza apresentaram crescimento microbiano, possivelmente por não respeitarem as normas corretas de boas práticas de fabricação (BUGNO et al., 2003).

Já foi relatado na literatura a utilização de espécie do gênero *Baccharis* como agente desinfetante e aliado a isso verificam-se as atividades antimicrobianas e antifúngicas conferidas a várias espécies do gênero, inclusive a espécie *B. dracunculifolia*, abrindo-se a possibilidade do desenvolvimento de um produto com atividade desinfetante baseado em um produto natural (AVANCINI et al., 2000).

A necessidade de produtos saneantes que apresentem maior eficácia, baixo custo e maior segurança de uso são focos de pesquisas por novas substâncias biocidas. A utilização de derivados ativos de origem vegetal, como o óleo de pinho, se apresenta como alternativas aos produtos químicos tóxicos e abrasivos, demonstrando potencial utilização de produtos de origem natural para o desenvolvimento de produtos com ação desinfetante e sanitizante. Visto todos os dados relatados na literatura sobre as atividades conferidas às espécies *B. dracunculifolia* e *P. elliottii*, ambas apresentam-se como possíveis focos de pesquisas na área.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o potencial do extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* para ser utilizado, sozinho ou associado ao extrato de *P. elliottii*, como agente sanitizante e/ou esterilizante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato das folhas de *B. dracunculifolia*, das frações obtidas do mesmo por partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, do extrato do lavado de tricomas glandulares das folhas de *B. dracunculifolia* e do extrato hidroalcoólico da raiz de *B. dracunculifolia*, bem como de substâncias isoladas dos mesmos e padrões comerciais previamente identificados na espécie frente à *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*, *B. subtilis*, *H. pylori*, *T. mentagrophytes* e *C. albicans*.

Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato da resina de *P. elliottii* e substância isolada do mesmo frente à *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*, *B. subtilis*, *H. pylori*, *T. mentagrophytes*, *C. albicans*.

Avaliar a influência da associação do extrato de *B. dracunculifolia* e frações e do extrato de *P. elliottii* a antimicrobianos de uso comercial frente aos micro-organismos *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*, *B. subtilis*, *H. pylori*, *T. mentagrophytes*, *C. albicans*.

Avaliar o potencial desinfetante bactericida da solução hidroalcoólica de extrato de *Baccharis dracunculifolia* a 0,2% em álcool a 40° GL, frente a *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*.

Avaliar o potencial desinfetante fungicida da solução hidroalcoólica de extrato de *B. dracunculifolia* a 0,2% em álcool 40°GL e da solução hidroalcoólica do extrato de *P. elliottii* 0,2% em álcool 40 °GL frente a *T. mentagrophytes*.

Avaliar a atividade desinfetante esporocida da solução hidroalcoólica do extrato de *B. dracunculifolia* a 0,2% em álcool a 40% em associação com extrato de *P. elliottii* frente à *Bacillus subtilis* e *Clostridium sporogenes*.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

PARTE I – ESTUDO FITOQUÍMICO

3.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *B. dracunculifolia*

B. dracunculifolia foi coletada na cidade de Ribeirão Preto no campus da Universidade de São Paulo. O material vegetal foi submetido a secagem em estufa de ar quente e circulante (modelo 170 N° 370/82) a 40 °C, durante 48 horas. Após secagem, as folhas foram separadas dos ramos e submetidas a moagem em moinho de facas para obtenção de um pó fino.

Os pós das folhas (1000 g) foram submetidos à maceração por um período de 48 horas em solução hidroalcoólica (etanol: água 96:4 v/v), seguido de filtração, sendo que este processo foi repetido até esgotamento do material vegetal. As soluções hidroalcoólicas obtidas foram filtradas e transferidas para balões de fundo redondo e concentradas a vácuo com auxílio de rotaevaporador a vácuo Fisatom (modelo 801), à temperatura de 45 ± 5 °C até eliminação do etanol, seguindo-se a liofilização, possibilitando assim a obtenção de 194,77 g de extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* (extrato BD), com rendimento aproximado de 20%.

O extrato BD (20 g) foi submetido a partições com solventes orgânicos para a separação inicial de seus componentes. O extrato BD foi solubilizado em MeOH:H₂O(9:1 v/v), transferido para funil de separação e extraído com hexano por processo de partição líquido-líquido. À fase hexânica adicionou-se sulfato de sódio anidro para eliminação da água e, em seguida, a solução foi filtrada, transferida para balão de fundo redondo e concentrada com auxílio de rotaevaporador à temperatura de 45 ± 5 °C. Após a concentração, o líquido remanescente foi transferido para frasco previamente pesado e denominado fração hexânica do extrato BD (F. hexânica BD). A solução hidrometanólica restante foi rotaevaporada, até a eliminação do metanol, ressuspensa em água destilada e particionada com diclorometano. À fração diclorometanólica foi adicionado sulfato de sódio anidro, a qual foi filtrada e transferida para balão de fundo redondo e concentrada em rotaevaporador, transferida para frasco previamente pesado e denominada fração em diclorometano do extrato BD (F. CH₂Cl₂ BD). A solução remanescente foi rotaevaporada e particionada com acetato de etila. À fração em acetato de etila foi adicionado sulfato de sódio anidro, a qual foi filtrada e transferida para balão de fundo redondo e concentrada em rotaevaporador, transferida para frasco previamente pesado e denominada fração em acetato de etila do extrato BD (F. AcOEt BD). A solução aquosa remanescente foi particionada com *n*-butanol, sendo que as fases orgânicas foram reunidas, concentradas em rotaevaporador até a eliminação do solvente e transferida para frasco

previamente pesado e denominada fração em *n*-butanol do extrato BD (F. *n*-BuOH BD). A fração aquosa final e as fases orgânicas resultantes das partições foram liofilizadas. As frações obtidas e seus rendimentos estão apresentados na Figura 3. Utilizou-se em todos os processos de maceração, partições e sistemas cromatográficos solventes P.A. de marcas comerciais ou solventes de grau técnico previamente submetidos a destilação fracionada.

As frações obtidas pelo processo de partição líquido-líquido foram utilizadas nas avaliações de atividade antimicrobiana, bem como o extrato BD. O extrato BD foi submetido à cromatografia de contracorrente (CCC) com a finalidade da separação de seus constituintes.

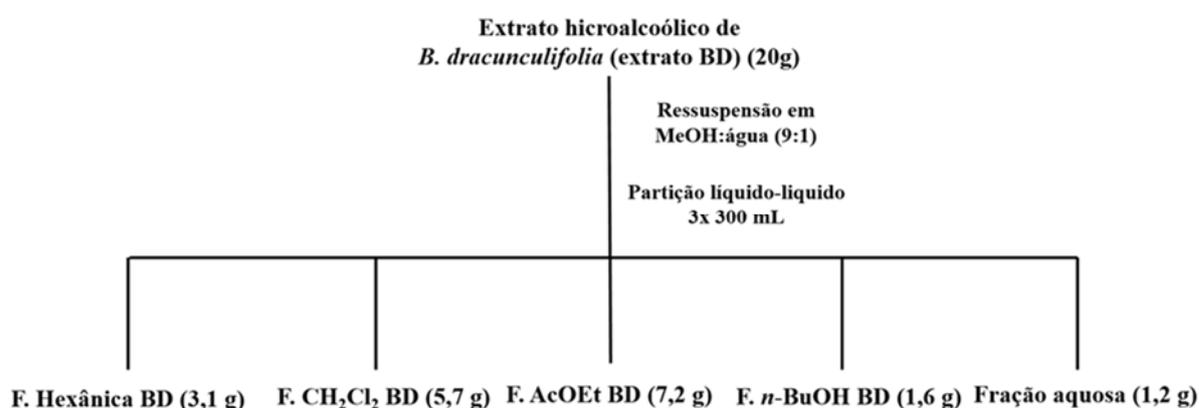


Figura 3. Partição do extrato de *B. dracunculifolia* com rendimento das frações.

3.2 COLETA E ESTABILIZAÇÃO DAS FOLHAS DE *B. dracunculifolia* PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO DE LAVAGEM DE TRICOMAS FOLIARES (BD-L)

Os ramos de *B. dracunculifolia* foram coletados na cidade de Ribeirão Preto-SP, no campus da Universidade de São Paulo. O material vegetal foi submetido à secagem em estufa de ar circulante (40 °C) durante 48 horas.

Após secagem do material vegetal as folhas foram separadas dos ramos e observadas em lupas de aumento para a verificação da presença dos tricomas glandulares.

As folhas secas (473,52 g) foram lavadas com acetona durante 30 segundos, com o auxílio de um agitador, à temperatura ambiente. Após a lavagem a solução foi concentrada a vácuo com auxílio de rotaevaporador à temperatura de 45 ± 5 °C e seca em estufa de ar circulante, obtendo-se assim o extrato de lavado glandular (BD-L). O extrato foi submetido a

processos de partição líquido-líquido e métodos cromatográficos de separação na tentativa de isolamento de seus componentes majoritários.

3.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS RAÍZES DE *B. dracunculifolia*

As raízes de *B. dracunculifolia* foram coletadas na cidade de Ribeirão Preto-SP, no campus da Universidade de São Paulo. Após a coleta as raízes foram limpas, com água corrente e álcool 70 °GL, e em seguida colocadas em estufa de ar quente e circulante (40°C) até secagem do material. Após a secagem as raízes foram cortadas e moídas em moinho de facas. O material moído (983,45 g) foi submetido a maceração utilizando solução hidroalcoólica (etanol: água 96:4 v/v). Foram realizados três ciclos de 24 horas de maceração, seguidos de três ciclos de 48 horas. Os extratos hidroalcoólicos foram reunidos e concentrados com auxílio de rotaevaporador fornecendo o extrato hidroalcoólico bruto das raízes de *B. dracunculifolia* (BD-R: 25,33 g). O extrato foi submetido a processos de partição e métodos cromatográficos de separação na tentativa de isolamento de seus componentes majoritários.

3.4 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BD-R E BD-L POR PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Os extratos BD-R e BD-L foram submetidos à partição com solventes orgânicos para possibilitar a separação inicial de seus componentes. Os extratos foram solubilizados em solução de metanol – água (9:1 v/v) e, em seguida, extraídos com hexano por processo de partição líquido-líquido. À fase hexânica foi adicionado sulfato de sódio anidro para a eliminação da água e, em seguida, a solução foi filtrada e transferida para balão de fundo redondo e concentrada com auxílio de rotaevaporador à temperatura de $45 \pm 5^\circ\text{C}$. Após esse processo as soluções foram transferidas para frascos previamente pesados e denominadas fração hexânica do lavado glandular (BD-LH) e fração hexânica da raiz (BD-RH).

A solução hidrometanólica restante de cada extrato foi rotaevaporada até a eliminação do metanol, seguido de adição de água destilada e partição com acetato de etila. À fase acetato de etila foi adicionado sulfato de sódio anidro, a qual foi filtrada e transferida para balão de fundo redondo e concentrada em rotaevaporador fornecendo a fração em AcOEt do lavado glandular (BD-LAc) e fração acetato de etila da raiz (BD-RAc) de *B. dracunculifolia*. A solução restante foi rotaevaporada para eliminação de resquícios de solventes orgânicos e liofilizada,

sendo denominada fração aquosa do extrato da raiz (BD-RAq) e fração aquosa do lavado glandular (BD-LAq). As massas das frações obtidas encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Massas dos extratos e das frações obtidas por partição líquido-líquido.

Extratos: massa	Frações	Códigos	Massas (g)
BD-L: 43,96 g	Fração hexânica do lavado glandular	BD-LH	1,739 g
	Fração acetato de etila do lavado glandular	BD-LAc	25,136 g
	Fração aquosa do lavado glandular	BD-LAq	5,462 g
BD-R: 25,33 g	Fração hexânica da raiz	BD-RH	2,5 g
	Fração acetato de etila da raiz	BD-RAc	5,3 g
	Fração aquosa da raiz	BD-RAq	12,6 g

3.5 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *B. dracunculifolia* POR CROMATOGRAFIA DE CONTRACORRENTE (CCC)

O extrato de *B. dracunculifolia* foi submetido a separações por CCC em aparelho de cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC – High-speedy countercurrent chromatography) modelo Quatro CCC TM MK 5 & MK 6 (AECS- QuikPrep TM Ltd., Reino Unido), equipado com duas bobinas, cada uma contendo duas colunas em PTFE (Bobina 1: coluna A: 208 mL, d.i. 3,2 mm e coluna B: 29 mL, d.i. 1,0 mm; Bobina 2: coluna C: 102 mL, d.i. 2,0 mm e coluna D: 105 mL d.i. 2 mm).

Para avaliação preliminar utilizou-se a coluna C no sentido ascendente. Para possibilitar a injeção de maior quantidade de extrato, e verificação dos rendimentos, novos fracionamentos foram realizados utilizando-se a coluna A e as colunas C e D acopladas. Utilizou-se a alça do injetor com capacidade de 10 mL para introdução da amostra no sistema. A rotação utilizada foi de 850 rpm, na temperatura de 35 °C.

3.6 ESCOLHA DOS SOLVENTES PARA O DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE SOLVENTES

Para a seleção dos solventes que seriam utilizados no processo de fracionamento, determinou-se a solubilidade de 10 mg da amostra em 1 a 5 mL dos solventes: hexano, AcOEt, *n*-butanol, MeOH e água. O extrato de *B. dracunculifolia* foi pesado e transferido para tubos de ensaio, onde adicionou-se quantidades crescentes dos solventes avaliados e determinou-se qual a quantidade necessária de cada solvente para a solubilização total ou parcial do extrato.

O extrato apresentou-se totalmente solúvel em AcOEt, MeOH e *n*-butanol, praticamente insolúvel em hexano e insolúvel em água. Assim metanol e *n*-butanol foram selecionados para compor, cada um, uma das fases do sistema. Como os dois solventes escolhidos são miscíveis, escolheu-se para compor as fases dois solventes no qual o extrato apresentava-se insolúvel ou pouco solúvel para que os mesmos atuassem como agentes de seletividade e proporcionassem a imiscibilidade do sistema. Sendo assim, o hexano e a água foram escolhidos para compor, cada um, uma das fases do sistema. A proposta inicial para a composição do sistema de solventes pode ser verificada na Tabela 2.

Tabela 2. Proposta inicial do sistema de solvente para fracionamento do extrato bruto de *Baccharis dracunculifolia* por CCC.

	Fase superior/orgânica	Fase inferior/aquosa
Solventes	Hexano: <i>n</i> -BuOH	MeOH: água destilada
Proporção (v/v) mL	0,2 : 1	0,2 : 1

As avaliações para a determinação da mistura de solventes e suas proporções foram realizadas em proveta graduada de 10 mL. Os solventes foram adicionados à proveta e agitados por 30 segundos. Após a agitação, o sistema permaneceu em repouso até completa separação entre as fases que o compunham. Ao sistema previamente equilibrado foram adicionados 10 mg do extrato bruto seguindo-se agitação manual por 30 segundos. Após decantação, volumes iguais de ambas as fases foram analisados em placas de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), as quais foram eluídas em fase móvel constituída por Hexano: AcOEt (6:4 v/v) e observadas em radiação UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, para a avaliação relativa das substâncias de interesse nas fases superior/orgânica e inferior/aquosa. A escolha das fases foi determinada pelos seguintes fatores: manutenção da distribuição equilibrada dos compostos de interesse nas duas fases, a menor diferença do volume da fase superior e inferior, formação ou não de emulsão e obtenção de tempo de decantação das fases abaixo de 30 segundos.

O sistema de solventes utilizado como proposta inicial apresentou ótimo tempo de decantação. Porém, a proporção entre as fases e a distribuição dos componentes majoritários entre as mesmas não se apresentou satisfatório. Na tentativa de proporcionar melhor distribuição dos componentes do extrato entre as duas fases do sistema, mantendo-se o tempo reduzido de decantação entre as fases e a melhora na proporção volumétrica entre as mesmas, foram realizadas várias avaliações, nas quais as quantidades de solventes foram alteradas e alguns solventes foram alternados, até a obtenção do sistema de solventes que apresentou a melhor opção para o fracionamento. As avaliações para a determinação do sistema de solventes utilizado estão apresentadas na Tabela 3

Tabela 3. Desenvolvimento de proporção ideal do sistema de solventes para fracionamento do extrato bruto de *B. dracunculifolia* por CCC.

Testes	Sistema de solventes (mL)					Proporção das fases/ sup: inf (v/v)	Tempo de decantação (s)
	hexano	<i>n</i> -BuOH	MeOH	água	AcOEt		
1	0,2	1,0	0,2	1,0	-	1,7/0,7	9
2	0,4	1,0	0,2	1,0	-	1,0/0,9	9
3	0,6	1,0	0,2	1,0	-	1,7/1,1	10
4	0,8	1,0	0,2	1,0	-	1,7/1,3	10
5	1,0	1,0	0,2	1,0	-	1,7/1,5	17
6	0,6	1,0	0,2	0,6	-	1,3/1,1	27
7	0,6	1,0	0,2	0,8	-	1,5/1,5	27
8	1,0	1,0	0,2	0,8	-	1,5/1,5	13
9	-	-	0,2	1,0	1,0	1,1/1,1	60
10	-	0,2	0,2	1,0	1,0	1,2/1,2	30
11	1,0	0,2	0,2	1,0	-	1,4/1,0	9
12	1,0	0,2	0,2	1,0	-	1,3/1,0	10
13	1,0	-	0,4	0,4	1,0	1,0/1,8	16
14	1,0	-	0,6	0,4	1,0	1,2/1,8	14

Após as análises de vários possíveis sistemas de eluição, bem como a mudança de constituição e proporção entre os solventes, optou-se pelo sistema representado na Tabela 4, Hexano:AcOEt (1:1):: MeOH:H₂O (0,6:0,4), por apresentar boa proporção entre as fases 1,2: 1,8 (fase aquosa: fase orgânica) além de bom tempo de decantação de 14s entre as mesmas.

Outro fator que levou a escolha desta mistura de solventes foi a análise da distribuição dos componentes majoritários do extrato entre as duas fases. O extrato foi adicionado ao sistema de solventes, agitado e após a decantação as duas fases foram analisadas por CCDC. Foi possível verificar que as substâncias majoritárias se encontravam em concentrações

relativamente semelhantes nas duas fases do sistema, o que é um fator importante para o processo de fracionamento por CCC.

Tabela 4. Sistema de solventes utilizado para fracionamento do extrato bruto de *B. dracunculifolia* por CCC.

	Fase superior/orgânica	Fase inferior/aquosa
Solventes	Hexano: AcOEt	MeOH: H ₂ O destilada
Proporção (v/v) mL	1: 1	0,6: 0,4

3.7 PREPARO DO SISTEMA DE SOLVENTES E AMOSTRA PARA CCC

O sistema de solventes foi preparado nas proporções previamente definidas, em volumes coerentes com as colunas a serem utilizadas. Adicionou-se em funil de separação todos os solventes a serem utilizados, procedeu-se a agitação vigorosa por 1 minuto e após esse procedimento as fases permaneceram em repouso por 18 horas em temperatura ambiente, para proporcionar o equilíbrio entre as mesmas. Após esse período as fases foram coletadas em frascos com tampa e degaseificadas por 10 minutos, com auxílio de aparelho de ultrassom.

Para o primeiro fracionamento utilizando-se a coluna D (105 mL) procedeu-se a injeção de 1,0 g do extrato quando o fracionamento foi realizado utilizando-se a coluna A (208 mL). Utilizando-se as colunas C e D acopladas (volume total 207 mL) utilizou-se maior quantidade de extrato (2,5 g).

As amostras foram solubilizadas em 9 mL da mistura 1:1 (fase orgânica:fase aquosa) do sistema de solventes. Após a adição dos solventes a amostra foi submetida à sonicação em aparelho de ultrassom, seguido de filtração em algodão hidrófilo para ser utilizada.

3.8 FRACIONAMENTO DO EXTRATO DE *B. dracunculifolia* POR CCC

O sistema de solvente foi eluído em modo normal, com injeção no sentido ascendente. A vazão utilizada foi de 2 mL/min com rotação do aparelho em 850 rpm e coleta de volumes de 5 mL e 10 mL, variando de acordo com a coluna utilizada. Após preenchimento da coluna com a fase estacionária iniciou-se a rotação do sistema e a fase móvel foi bombeada até que não houvesse arraste da fase estacionária.

A retenção da fase estacionária foi calculada pela razão entre o volume da fase estacionária retido no interior do aparelho e o volume total de capacidade da coluna, resultando em percentual de retenção da fase estacionária. O percentual de retenção deve se manter superior a 80%, para garantir o equilíbrio entre as duas fases. Após estabilização da coluna injetou-se a amostra na alça de injeção e permitiu-se que a amostra entrasse no sistema para início da cromatografia.

Como análise preliminar procedeu-se um primeiro fracionamento do extrato de *B. dracunculifolia* utilizando-se a coluna D ($v = 105$ mL, d.i. 2 mm). Na tentativa de se avaliar se o volume total da coluna utilizada, a quantidade de extrato utilizado no fracionamento e o diâmetro interno das colunas alterariam o rendimento final das frações obtidas, foram realizados dois fracionamentos utilizando-se a coluna A ($v = 208$ mL, d.i. 3.2 mm) e um fracionamento utilizando-se as colunas C e D acopladas (volume total = 207 mL, d.i. 2 mm).

Durante o processo de fracionamento foram coletados entre 40 e 61 tubos com volumes de 5 ou 10 mL em cada, os quais variaram de acordo com a coluna utilizada. Os primeiros 40 tubos foram coletados com a rotação do aparelho ligada e a partir do tubo 41 a rotação do aparelho foi desligada e prosseguiu-se a coleta até o esgotamento da fase móvel. Os volumes coletados foram reunidos em frações de acordo com a semelhança observada em análise por CCDC obtendo-se entre 6 e 10 frações finais por fracionamento. As frações foram reunidas, concentradas e pesadas (Balança analítica Sartorius modelo BL 210-S) para proceder-se o cálculo de rendimento e as análises de perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo analítico.

Analisando-se os rendimentos obtidos para cada fracionamento pode-se concluir que o fracionamento realizado na coluna C (105 mL) apresentou proporcionalmente maior rendimento que os outros fracionamentos, mesmo apresentando baixa quantidade em massa por fração. Os resultados de rendimento de cada um dos fracionamentos estão apresentados nas Tabelas de 5 a 8.

Tabela 5. Fracionamento do extrato bruto de *B. dracunculifolia* (1,0 g) por CCC, utilizando coluna C (105 mL).

Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
F 1 BD10 – 14	60	6	F 4 BD 21 – 30	61	6,1
F 2 BD 15 – 17	30	3	F 5 BD 31 – 36	23	2,3
F 3 BD 18 – 20	20	2	F 6 BD 37 – 43	15	1,5

Tabela 6. Primeiro fracionamento do extrato bruto de *B. dracunculifolia* (2,5 g) por CCC, utilizando coluna A (208 mL).

Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
F 1 BD 11-16	105	4,2	F 4 BD 32 -37	67,3	3
F 2 BD 17-23	16,2	0,6	F 5 BD 38 -43	59	2,4
F 3 BD 24-30	66,7	2,7	F 6 BD 45	8,4	0,33

Tabela 7. Segundo fracionamento do extrato bruto de *B. dracunculifolia* (2,5 g) por CCC, utilizando coluna A (208 mL).

Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
F 1 BD 15-20	35,2	1,4	F 4 BD 35-42	46	1,8
F 2 BD 21-28	155	6,2	F 5 BD 43-46	45	1,8
F 3 BD 29-34	85	3,4	F 6 BD 47	18,2	0,7

Tabela 8. Fracionamento do extrato bruto de *B. dracunculifolia* (2,5 g) por CCC, utilizando as colunas C e D acopladas (207 mL).

Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
F 1 BD 12-13	39,6	1,6	F 6 BD 33-38	35,9	1,4
F 2 BD 14-16	36,6	1,5	F 7 BD 39-42	21,6	0,9
F 3 BD 17-22	70,8	2,8	F 8 BD 43-47	53,1	2,1
F 4 BD 23-27	45,2	1,8	F 9 BD 48-53	104,5	4,2
F 5 BD 28-32	26	1,1	F 10 BD 54-61	191,3	7,7

3.9 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA A VÁCUO (CLV) DA FRAÇÃO BD-LAC

Parte da fração BD-LAc (10 g) foi submetida a cromatografia líquida a vácuo, empregando-se uma coluna de 5 cm de diâmetro por 10 cm de altura empacotada com 5 cm de altura de sílica gel 60H 230-240 mesh (0,040-0,063 mm) Sigma. Foram coletadas dez frações de 500 mL cada, utilizando-se como sistema eluente misturas de hexano e AcOEt com polaridades crescentes, conforme descrito na Tabela 9. Após a análise dos perfis das frações por CCDC optou-se por reunir as frações BD-LAc IV a VI para serem submetidas a cromatografia flash, na tentativa de separação de seus componentes.

Tabela 9. Sistema de solventes utilizados e frações obtidas a partir da cromatografia líquida a vácuo, assim como suas respectivas massas

Sistema de Solventes (%)	Frações	Massa (mg)
Hexano	BD-LAc I	0,0760
Hexano : AcOEt (8/2)	BD-LAc II	0,0911
Hexano : AcOEt (7/3)	BD-LAc III	0,6446
Hexano : AcOEt (65/35)	BD-LAc IV	1,7539
Hexano : AcOEt (6/4)	BD-LAc V	1,1835
Hexano : AcOEt (55/45)	BD-LAc VI	0,7589
Hexano : AcOEt (1/1)	BD-LAc VII	0,5378
Hexano : AcOEt (3/7)	BD-LAc VIII	1,1161
AcOEt	BD-LAc IX	1,5465
MeOH	BD-LAc X	2,3652

3.10 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM COLUNA CLÁSSICA DE FRAÇÕES DO LAVADO DE TRICOMAS GLANDULARES DAS FOLHAS DE *B. dracunculifolia*

Na tentativa de se isolar metabólitos secundários, de caráter apolar, presentes no extrato do lavado glandular de *B. dracunculifolia*, foram reunidas as frações BD-LH, obtida a partir do processo de partição líquido-líquido e as frações enumeradas de I a VI, obtidas do processo de fracionamento em CLV da fração BD-LAc. A amostra resultante dessa reunião BD-HLAc I-VI (5,436 g) foi submetida à cromatografia líquida em coluna clássica, empregando-se uma coluna de 8,5 cm de diâmetro interno e 150 cm de altura, previamente empacotada com 900 g de sílica gel 60H (60-230 mesh), obtendo-se assim a proporção de 1,0 g de amostra para aproximadamente 150 gramas de sílica.

Foram coletadas 463 frações de 100 mL cada, utilizando-se como eluentes hexano:AcOEt na proporção inicial 99:1. Ao longo do processo de eluição foi-se aumentando a polaridade do sistema adicionando-se progressivamente 1% de AcOEt até que fosse atingida a proporção de hexano: AcOEt (95:5). A partir desse momento procedeu-se ao aumento gradual da polaridade do sistema com a adição progressiva de AcOEt até a proporção hexano: AcOEt (1:1), seguida de eluição com AcOEt e MeOH.

As frações foram analisadas por CCDC o que possibilitou a reunião das mesmas e obtenção de 30 frações. As 30 frações também foram analisadas em CCDC possibilitando assim a escolha das frações que foram submetidas à análise em CLAE- UV- DAD. As frações 10 a 30 foram analisadas por CLAE possibilitando a escolha das frações que foram submetidas à CLAE-PREP para o isolamento de compostos. As frações obtidas pelo processo cromatográfico estão apresentadas na Tabela 10, bem como seus rendimentos finais em massa.

Tabela 10. Frações obtidas da cromatografia clássica da fração BD-HLAc I-VI.

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
BD-HLAc 1	14,5	BD-HLAc 11	33,1	BD-HLAc 21	16,6
BD-HLAc 2	23,4	BD-HLAc 12	50,6	BD-HLAc 22	38,5
BD-HLAc 3	19,4	BD-HLAc 13	89,0	BD-HLAc 23	97,7
BD-HLAc 4	8,7	BD-HLAc 14	160,4	BD-HLAc 24	153,7
BD-HLAc 5	2,6	BD-HLAc 15	90,0	BD-HLAc 25	87,9
BD-HLAc 6	83,0	BD-HLAc 16	49,8	BD-HLAc 26	499,1
BD-HLAc 7	13,5	BD-HLAc 17	37,8	BD-HLAc 27	685,6
BD-HLAc 8	67,0	BD-HLAc 18	3,5	BD-HLAc 28	67,8
BD-HLAc 9	15,0	BD-HLAc 19	111,9	BD-HLAc 29	201
BD-HLAc 10	128	BD-HLAc 20	28,6	BD-HLAc 30	216,1

3.11 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA CLÁSSICA DA FRAÇÃO BD-RH

A fração BD-RH (2,5 g) foi submetida à cromatografia líquida em coluna clássica, utilizando-se uma coluna de vidro com 3 cm de diâmetro interno e 80 cm de altura. A coluna foi empacotada com 100 gramas de sílica gel 60 H (60 – 230 Mesh), na proporção de 1,0 grama de amostra para 40 gramas de sílica.

A coluna foi eluída inicialmente com hexano e conforme procedeu-se a eluição adicionou-se AcOEt à mistura de eluentes aumentando assim gradativamente a polaridade do sistema.

Foram coletadas 183 frações de 20 mL cada, que foram analisadas por CCDC e permitiram a reunião em 18 frações, que estão apresentadas, assim como suas respectivas massas na Tabela 11. Durante o processo cromatográfico algumas frações apresentaram precipitados cristalinos. As análises por CCDC indicaram que essas frações apresentavam-se menos complexas indicando a presença de grande quantidade de um composto majoritário. Como tentativa de purificação destes compostos essas frações foram submetidas ao processo de recristalização em meio líquido como descrito no item 3.12.

Tabela 11. Frações obtidas do fracionamento em coluna clássica da fração BD-RH.

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
BD-RH 1	2,3	BD-RH 10	22,6
BD-RH 2	4,1	BD-RH 11	76,2
BD-RH 3	430,0	BD-RH 12	62,0
BD-RH 4	18,4	BD-RH 13	38,0
BD-RH 5	10,3	BD-RH 14	31,1
BD-RH 6	7,5	BD-RH 15	15,8
BD-RH 7	6,6	BD-RH 16	287,7
BD-RH 8	89,8	BD-RH 17	210,0
BD-RH 9	15,6	BD-RH 18	116,1

3.12 PURIFICAÇÃO POR RECRISTALIZAÇÃO DAS FRAÇÕES DE BD-RH

As frações BD-RH 3 e BD-RH 9, 10 e 11 obtidas a partir da cromatografia clássica da fração BD-RH, foram solubilizadas em hexano e transferidas para balões de 50 mL de fundo redondo. As amostras foram secas com auxílio de rotaevaporador a temperatura de 40 °C. Após a secagem as amostras foram resuspendidas em acetona, solubilizadas com pequenas quantidades de hexano e submetidas a aquecimento em banho à 60°C para auxiliar a solubilização. Os balões foram fechados e mantidos em temperatura ambiente até a formação dos cristais. Após a formação completa dos cristais o sobrenadante foi retirado e os cristais recolhidos, secos e pesados. O procedimento possibilitou o isolamento de duas substâncias: BdR - 1 = 310,9 mg e BdR - 2 = 57,6 mg. Fotos demonstrativas dos cristais obtidos no processo estão apresentadas respectivamente nas Figuras 4 e 5.

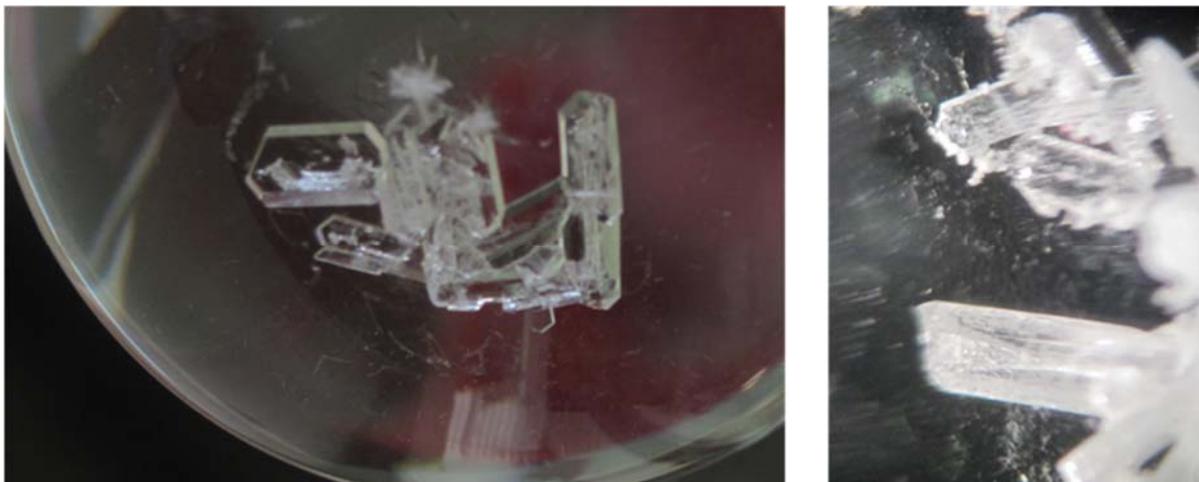


Figura 4. Cristais da substância BdR-1.

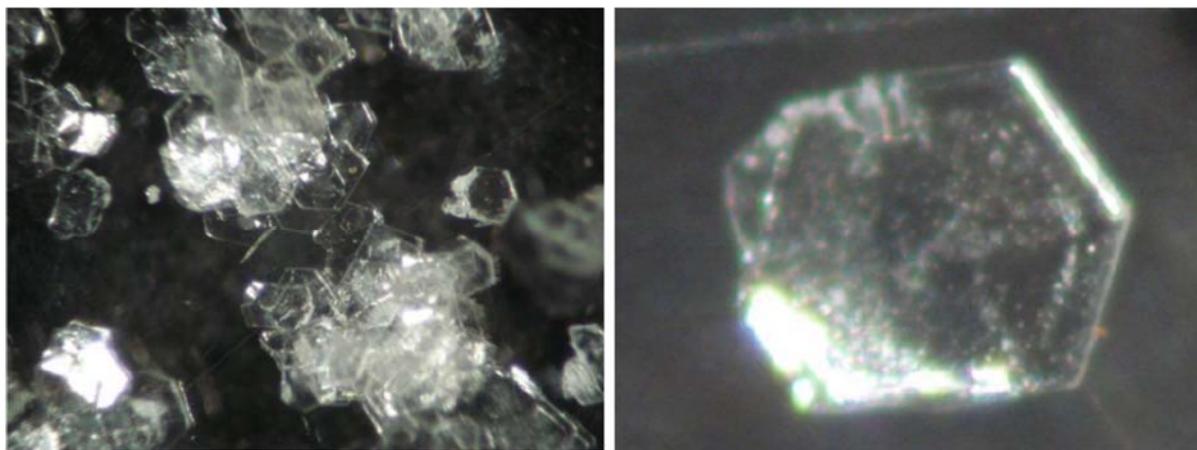


Figura 5. Cristais da Substância BdR-2.

3.13 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR CCDC E PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE-UV-DAD PARA OS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *B. dracunculifolia*

Os extratos de *B. dracunculifolia* e frações obtidas ao longo de todos os processos de separação foram avaliados por CCDC utilizando-se cromatoplasmas de sílica gel 60 F 254 (Whatman). As placas foram eluídas em hexano: AcOEt (6:4 v/v), observadas em radiação UV no comprimento de onda de 365 nm e reveladas por pulverização com revelador anisaldeído sulfúrico (solução de ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído) (50:1:0,5) seguido de aquecimento em placa quente.

Os perfis cromatográficos do extrato bruto das folhas de *B. dracunculifolia* (extrato BD) do extrato de lavagem de tricomas glandulares (BD-L), extrato hidroalcoólico da raiz (BD-R), bem como das frações resultantes dos mesmos foram obtidos por meio de CLAE em modo analítico. As análises foram realizadas em cromatógrafo analítico da marca Shimadzu com controlador do modelo SLC-10 Avp, detector de arranjo de diodos Shimadzu (UV-DAD) do modelo SPD-M10 Avp, auto-injetor do modelo SIL-10 Avp e degaseificador do modelo DGU-14 A. O cromatógrafo é acoplado a um computador contendo o software ClassVP versão 5.02. Algumas amostras foram analisadas em cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência da marca Waters, com sistema binário de bombas modelo 1525, equipado com sistema de auto-injeção da marca Waters, modelo 2707, acoplado a um detector DAD modelo 2998 e as análises foram realizadas utilizando-se software Empower™ 3.

Para as análises empregou-se coluna analítica de fase reversa C18 shim-pack ODS (H) (4,6 mm ID x 25 mm L). Para eluição aplicou-se um gradiente contendo os solventes MeOH:H₂O acidificado com ácido acético (pH: 2,7), vazão de 0,8 mL/min e tempo de eluição de 79 minutos, conforme gradiente de solventes descrito na Tabela 12. Para a realização das análises por CLAE utilizou-se solventes ultrafiltrados de grau HPLC de marcas comerciais.

Tabela 12. Gradiente de solventes utilizado como fase móvel para análise em CLAE das frações obtidas pelo fracionamento do extrato de *B. dracunculifolia*.

Tempo (min)	Solvente (%)	
	Metanol	Água acidificada
0,01	20	80
70,00	100	0
73,00	100	0
74,00	20	80
79,00	20	80

3.14 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS DE *B. dracunculifolia* EM CLAE-PREP

A análise dos perfis cromatográficos em CLAE-UV-DAD, das frações obtidas a partir do processo de fracionamento em HSCCC do extrato bruto de *B. dracunculifolia* bem como do fracionamento em coluna clássica da fração BD-LAc possibilitou a seleção das frações que apresentaram picos majoritários em valor de área, as quais foram submetidas à CLAE em modo preparativo (CLAE-PREP) para isolamento de compostos.

A CLAE-PREP foi realizada utilizando-se coluna C18 shim-pack prep ODS (H) (20 mm ID x 25 mm L; Shimadzu), em cromatógrafo preparativo Shimadzu acoplado a um computador contendo software *LC-solutions single*. Como fase móvel para eluição aplicou-se um gradiente contendo os solventes MeOH: H₂O, vazão de 8 mL/min e tempo de eluição de 79 min. Utilizou-se o mesmo gradiente de solventes utilizado para as análises por CLAE em modo analítico (Tabela 5). As amostras foram solubilizadas em 500 µL da mistura MeOH:água (1:1), centrifugadas e filtradas em filtro de 0,45 µm. As frações coletadas foram concentradas à vácuo em equipamento *SpeedVac (Thermo Corporation® Savant SPD 2010)*. Para a realização dos isolamentos por CLAE-PREP utilizou-se solventes ultrafiltrados de grau HPLC de marcas comerciais.

3.15 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE *Pinus elliottii* E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS PARA AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA

A resina de *P. elliottii* foi adquirida por meio de doação pela Reserva Biológica Mogi-Guaçu, antiga fazenda Campininha, área de conservação administrada pelo Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, situada na cidade de Mogi-Guaçu no interior do estado de São Paulo.

A resina foi submetida ao processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger. Para tanto, foram pesados 100 g de resina bruta em um balão de fundo redondo e boca esmerilhada e adicionou-se de 1000 mL de água destilada. Em seguida, acoplou-se ao balão o aparato de Clevenger e procedeu-se ao aquecimento em manta até a temperatura de 100°C. O processo foi realizado até o aparente esgotamento da fração volátil presente na resina. A fração volátil foi coletada e pesada, apresentando rendimento aproximado de 13% (12,87 g) e armazenada em freezer à temperatura de -8 °C até o momento de análise de seus componentes.

Após o processo de hidrodestilação, ao material restante no balão, denominado substâncias fixas, adicionou-se acetato de etila para promover a extração de substâncias de baixa e média polaridades presentes na amostra. O procedimento foi realizado três vezes e o material resultante foi concentrado com auxílio de rotaevaporador e liofilizado, fornecendo 65 g de um pó branco amorfo, de cheiro característico denominado extrato da resina de *P. elliottii* (extrato PE). O extrato PE foi submetido a análises por CCDC e CLAE, seguido de processos de fracionamento na tentativa de isolamento de seus componentes majoritários, bem como foi submetido a ensaios antimicrobianos.

3.16 ANÁLISE DO EXTRATO DA RESINA DE *P. elliotti* POR CLAE EM MODO ANALÍTICO E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS DE *P. elliottii* POR CLAE-PREP

As análises em CLAE-UV-DAD foram realizadas utilizando-se coluna analítica de fase reversa C18 shim-pack ODS (H) (4,6 mm ID x 25 mm L). Para eluição aplicou-se um gradiente contendo os solventes ACN:H₂O, vazão de 1 mL/min e tempo total de eluição de 40 minutos, mesmo gradiente utilizado para o processo de isolamento por CLAE-PREP descrito na Tabela 13.

A CLAE-PREP foi realizada utilizando-se coluna C18 shim-pack prep ODS (H) (20 mm ID x 25 mm L; Shimadzu), em cromatógrafo preparativo Shimadzu acoplado a um computador contendo software LC-solutions single. Como fase móvel para eluição aplicou-se

um gradiente contendo os solventes ACN: H₂O, vazão de 10 mL/min e tempo de eluição de 40 minutos. Utilizou-se o mesmo gradiente de solventes utilizado para as análises por CLAE em modo analítico e o gradiente de solventes utilizado para as análises está representado na Tabela 13. As amostras (100 mg) foram solubilizadas em 500 µL da mistura ACN: H₂O (1:1), centrifugadas e filtradas em filtro de 0,45 µm. As frações coletadas foram concentradas a vácuo em equipamento *SpeedVac*.

Tabela 13. Gradiente de solventes utilizado como fase móvel para análise em CLAE do extrato de *P. elliotii* e substâncias isoladas do mesmo.

Tempo (min)	Solvente (%)	
	Acetonitrila	Água
0,01	70	30
5	70	30
25	100	0
30	100	0
45	70	30
40	70	30

3.17 ANÁLISE DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE *P. elliotii* E DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS A PARTIR DA FRAÇÃO FIXA DA RESINA, POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM)

A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas foi utilizada para determinar a composição da fração volátil obtida a partir da resina de *P. elliotii*, bem como para fornecer maiores informações sobre a pureza das substâncias isoladas a partir do extrato PE por CLAE-PREP.

As análises foram realizadas no Núcleo de Apoio a Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), da FCFRP-USP sob a responsabilidade do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes. Para as análises utilizou-se cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas da Shimadzu modelo QP-2010, equipado com detector de massas de baixa resolução. Utilizou-se

a coluna para cromatografia gasosa DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) Agilent J&W. A aquisição dos espectros de massa foi de 40-500 razão carga-massa (m/z).

A identificação dos componentes da fração volátil foi efetuada com base nos dados dos espectros de fragmentação de massas e do índice de Kovats.

Os espectros de massas foram comparados com os da biblioteca do espectrômetro (FFNSC 1.3.) e com espectros disponíveis na literatura (Adams, 1995). Para o cálculo dos índices de Kovats, utilizou-se os dados de uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos saturados (C₉ a C₂₅) cromatografados na mesma coluna e em condições de análise iguais às utilizadas para análise da fração. Os índices de Kovats calculados foram comparados com índices da literatura (Adams, 1995; FFNSC 1.3.).

A identificação dos componentes foi efetuada com base nos dados dos espectros de fragmentação de massas, os quais foram comparados com os da biblioteca do espectrômetro (FFNSC 1.3. e NIST08.LIB) e com espectros disponíveis na literatura (Adams, 1995).

3.18 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Os metabólitos isolados e purificados foram submetidos à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e de ¹³C e UV, além de técnicas espectrométricas bidimensionais, tais como HMBC e HMQC. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C foram registrados em espectrômetros Bruker–Avance DRX₅₀₀, operando em 400 ou 500 MHz (RMN de ¹H) e 100 ou 125 MHz (RMN de ¹³C), sendo que as amostras foram preparadas utilizando-se solventes deuterados (Sigma-Aldrich). As análises foram realizadas no departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP-USP.

PARTE I – ENSAIO ANTIMICROBIANOS

3.19 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA FRENTE A BACTÉRIAS AERÓBIAS

3.19.1 *Micro-organismos*

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada frente aos seguintes micro-organismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Bacillus subtilis* (ATCC 19659) doados pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e mantidos em coleção de cultura a -20°C no laboratório de Farmacognosia- FCFRP/USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Niede A. J. C. Furtado

3.19.2 *Atividade antibacteriana*

A avaliação da atividade antibacteriana dos extratos, frações, substâncias isoladas e padrões comerciais foi realizada segundo metodologia preconizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS/CLSI, 2003) norma aprovada M7-A6, com modificações. O método utilizado foi a determinação da concentração inibitória mínima por microdiluição em microplacas. O meio de cultura utilizado foi o caldo Muller Hinton (MH) Difco™ e BBL™.

3.19.3 *Preparo do inóculo*

Para a realização dos ensaios utilizaram-se suspensões bacterianas padronizadas de micro-organismos a partir de uma cultura de 24 horas de crescimento em ágar Mueller Hinton. A suspensão bacteriana foi obtida utilizando-se solução de cloreto de sódio 0,9 % até obtenção de turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland (contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) /mL). As suspensões foram padronizadas por leitura espectrofotométrica em 625 nm, em espectrofotômetro Biospectro (Modelo SP-220), para confirmação da concentração de micro-organismos, sendo consideradas leituras de absorvância entre 0,100 a 0,110 satisfatórias para o preparo do inóculo. A partir das soluções que apresentaram leituras de absorvância satisfatórias realizaram-se diluições até a obtenção de suspensão em caldo MH contendo concentração $2,5 \times 10^6$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos experimentos.

3.19.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Os poços das microplacas foram preenchidos com 80 μL de caldo MH e, em seguida, foram adicionados 80 μL das soluções dos extratos, frações ou substâncias a serem avaliadas. Em seguida, procedeu-se a diluição seriada até o décimo segundo ponto, permitindo a obtenção de concentrações entre 0,195 a 400 $\mu\text{g/mL}$. Quando se avaliou substâncias isoladas e padrões, os resultados de CIM e CBM foram convertidos para μM . A cada poço foram adicionados 20 μL da suspensão bacteriana na concentração de $2,5 \times 10^6$ UFC/mL, obtendo-se a concentração final de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL, correspondente a concentração de 5×10^4 UFC por poço, em volume final de 100 μL por poço.

Os antibióticos padrões utilizados foram a penicilina (Sigma) (*S. aureus* e *B. subtilis*) nas concentrações de 0,003 a 5,9 $\mu\text{g/mL}$ ($8,9 \times 10^{-6}$ a $1,7 \times 10^{-2}$ μM) e a estreptomicina (Sigma) (*P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. choleraesuis*) nas concentrações de 0,144 a 295 $\mu\text{g/mL}$ ($2,48 \times 10^{-4}$ a 0,51 μM). Para a diluição seriada dos antibióticos dispensou-se em cada poço, 59 μL de caldo MH. Em seguida, pipetaram-se 59 μL da solução de antimicrobiano para uso (penicilina 20 $\mu\text{g/mL}$ e estreptomicina 1000 $\mu\text{g/mL}$), os quais foram adicionados no primeiro ponto. Então, realizou-se a diluição seriada até o décimo segundo ponto de onde foram retirados 59 μL para o controle de esterilidade do antimicrobiano. Foram adicionados 21 μL de caldo MH e 20 μL de suspensão bacteriana a cada poço.

Como controles foram realizados o controle de esterilidade dos extratos vegetais, frações e substâncias isoladas, o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano e o controle do solvente utilizado para solubilizar as amostras testadas, dimetilsulfóxido (DMSO).

As microplacas foram incubadas em estufa de cultura, Fanem LTDA (Modelo 002CB), a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação foram retiradas alíquotas de cada poço, utilizando-se a ponta de palitos esterilizados, e semeadas em placas de cultura contendo ágar MH. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas para determinação da CBM.

3.19.5 Determinação dos resultados

Após o período de incubação adicionou-se 20 µL da solução de resazurina (Sigma) na concentração de 0,02 % a cada poço das microplacas. Foram considerados positivos para ação antibacteriana os poços que não apresentaram mudança de coloração de azul para rosa, indicando assim ausência de crescimento bacteriano. A menor concentração onde não se observou a mudança de coloração foi considerada a CIM.

Foram consideradas como CBM, as menores concentrações capazes de inibir definitivamente o crescimento bacteriano, com base em alíquotas dos poços onde não houve crescimento na determinação da CIM, as quais foram semeadas em placas de cultura contendo ágar MH, como descrito anteriormente.

3.20 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

3.20.1 Micro-organismos

A avaliação da atividade antifúngica *in vitro* foi realizada frente aos micro-organismos *Tricophyton mentagrophytes* (ATCC 9533) e *Candida albicans* (ATCC 10231), doados pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), e mantidos em coleção de cultura a -20°C no laboratório de Farmacognosia-FCFRP/USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Niede A. J. C. Furtado

3.20.2 Atividade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica dos extratos, frações, substâncias isoladas e padrões comerciais foi realizada segundo metodologia preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (NCCLS/CLSI, 2002) norma aprovada M38-A para fungos filamentosos e norma aprovada M27-A2 para fungos leveduriformes. O método utilizado foi a determinação da concentração inibitória mínima por microdiluição em microplacas.

O meio de cultivo utilizado para a realização do experimento foi o caldo RPMI-1640 (GIBCO BRL® [Life Technologies, Grand Island, EUA], com glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado com [ácido 3-(N-morfolino)- propanossulfônico] MOPS) a pH 7,0.

3.20.3 Preparo do inoculo de *T. mentagrophytes*

A suspensão de conídios do fungo dermatófito *T. mentagrophytes* foi preparada a partir da adição de solução esterilizada de cloreto de sódio 0,85% às placas de cultura de 7 a 10 dias do micro-organismo em ágar de batata glicose (PDA) Difco™ e BBL™. Com o auxílio de alça esterilizada, em bancada de fluxo laminar vertical (Pachane, modelo 310), os conídios foram removidos da superfície da cultura e transferidos para tubos de vidro esterilizados. O inoculo foi ajustado por contagem de conídios em câmara de Neubauer e o inoculo foi diluído em meio RPMI-1640 para obtenção de uma suspensão final 1×10^5 conídios/mL.

3.20.4 Determinação da CIM e concentração fungicida mínima e (CFM) frente a *T. mentagrophytes*

Os poços das microplacas foram preenchidos com 100 μ L de meio RPMI 1640 e, em seguida, foram adicionados 100 μ L das soluções dos extratos, frações ou substâncias a serem avaliados. Procedeu-se a diluição seriada até o décimo segundo ponto, permitindo a obtenção de concentrações entre 0,195 a 400 μ g/mL. Quando se avaliou substâncias isoladas e padrões, os resultados de CIM e CFM foram convertidos para μ M. Adicionou-se a cada poço 80 μ L de meio RPMI 1640 e 20 μ L da suspensão de conídios, obtendo-se concentração final do inoculo de 1×10^4 conídios/mL, correspondente a 1×10^3 conídios/poço, em volume final de 200 μ L por poço.

O antifúngico padrão utilizado foi cetoconazol (Sigma) nas concentrações de 0,05 a 100 μ g/mL. ($9,42 \times 10^{-5}$ a 0,19 μ M). Para a diluição seriada do antifúngico adicionou-se 186 μ L de meio RPMI 1640 no primeiro ponto e 50 μ L de solução de antifúngico na concentração de 800 μ g/mL. Para cada um dos outros 11 pontos da diluição adicionou-se 118 μ L de meio. Prosseguiu-se a diluição seriada retirando-se do primeiro ponto 118 μ L, a diluição foi realizada até o décimo segundo ponto, de onde foram retirados 118 μ L para serem utilizados no controle de esterilidade do antifúngico. Foram adicionados 62 μ L de meio RPMI 1640 e 20 μ L de inoculo em cada poço. As microplacas foram incubadas por cinco dias a 30°C em câmara incubadora com demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D) Solab, modelo SL 200/334. Após o período de incubação foram retiradas alíquotas, utilizando-se a ponta de um palito esterilizado, e semeadas em placas contendo meio PDA. As placas foram incubadas por cinco dias 30°C em câmara incubadora B.O.D para a determinação da CFM.

3.20.5 Preparo do inoculo de *C. albicans*

O inoculo de *C. albicans* foi preparado a partir de placas de micro-organismos com 24 horas de crescimento em ágar sabouraud dextrose Difco™ e BBL™. Para o preparo do inoculo transferiu-se, em bancada de fluxo laminar, colônias isoladas do micro-organismo para tubos de ensaio contendo solução de cloreto de sódio 0,85% esterilizada até obtenção de turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland. A turvação obtida foi padronizada por leitura de absorvância entre 0,080 e 0,085 em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm e o inoculo foi padronizado para obtenção de uma suspensão na concentração de $7,5 \times 10^6$ UFC/mL. A suspensão inicial foi diluída em solução esterilizada de cloreto de sódio 0,85%, seguida de diluição em meio RPMI 1640 obtendo-se uma suspensão final 1 a 5×10^5 UFC/mL.

3.20.6 Determinação da CIM e CFM frente a *C. albicans*

Os poços das microplacas foram preenchidos com 80 μ L de caldo RPMI 1640. Em seguida, foram adicionados 80 μ L das soluções dos extratos, frações ou substâncias a serem avaliados e procedeu-se a diluição seriada até o décimo segundo ponto, permitindo a obtenção de concentrações entre 0,195 a 400 μ g/mL. Quando avaliou-se substâncias isoladas e padrões, os resultados de CIM e CFM foram convertidos para μ M.

Como antifúngico padrão utilizou-se o antimicrobiano fluconazol (Sigma) nas concentrações de 0,25 a 512 μ g/mL ($8,16 \times 10^{-4}$ a 1,67 μ M). Para a diluição seriada do antifúngico adicionou-se ao primeiro ponto da diluição seriada 144 μ L de meio RPMI 1640 e 16 μ L de solução de antifúngico em concentração inicial de 6400 μ g/mL. Nos outros 11 pontos da curva adicionou-se 80 μ L de meio RPMI 1640 e para a diluição seriada retirou-se do primeiro ponto da curva 80 μ L e prosseguiu-se até o décimo segundo ponto de onde foram retirados 80 μ L para serem utilizados como controle de esterilidade do antifúngico. A cada poço foram adicionados 20 μ L de suspensão final de conídios contendo $1-5 \times 10^4$ UFC/mL correspondente a 1 a 5×10^3 UFC/poço.

Como controles do experimento foram realizados controles de esterilidade dos extratos e substâncias isoladas, o controle do meio de cultura, o controle do crescimento fúngico e o controle do solvente utilizado para solubilizar as amostras testadas (DMSO).

As microplacas foram incubadas em estufa por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação foram retiradas alíquotas de cada poço, utilizando-se a ponta de palitos esterilizados, e semeadas em placas contendo ágar sabouraud dextrose, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

3.20.7 Determinação dos resultados

Após o período de incubação as microplacas foram retiradas das estufas e para verificação do resultado adicionou-se a cada um dos poços 20 µL de solução de resazurina a 0,02%. Foram considerados positivos para atividade antifúngica os poços que não apresentaram mudança de coloração de azul para rosa, indicando assim a ausência de crescimento fúngico. As menores concentrações onde não se observou a mudança de coloração foram consideradas as CIMs. Foram consideradas CFMs as menores concentrações capazes de inibir definitivamente o crescimento fúngico, o que foi confirmado com a semeadura de alíquotas dos poços onde não houve crescimento em placas de cultura contendo os meios respectivos para cada micro-organismo.

3.21 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA FRENTE A *H. pylori*

3.21.1 Micro-organismo

Helicobacter pylori (ATCC 43504), doado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), e mantidos em coleção de cultura a -20°C no laboratório de Farmacognosia- FCFRP/USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Niede A. J. C. Furtado

3.21.2 Atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana dos extratos, frações, substâncias isoladas e padrões comerciais foi realizada segundo metodologia preconizada pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (NCCLS/CLSI 2003) norma aprovada M7-A6, com modificações.

O meio de cultura utilizado foi o caldo de soja triptica (TSB) Difco™ e BBL™, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).

3.21.3 Preparo do inóculo

A suspensão bacteriana foi obtida a partir de uma cultura bacteriana de 72 horas do micro-organismo em ágar de soja triptica (TSA) suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado. A suspensão bacteriana foi obtida utilizando-se solução de cloreto de sódio 0,9% até obtenção de turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland (contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A suspensão foi padronizada por leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 625 nm. Absorvâncias entre 0,100 a 0,110 foram consideradas satisfatórias para o preparo do inóculo. A suspensão bacteriana foi diluída em solução de cloreto de sódio 0,9% e em caldo TSB suplementado com 10% de SFB até obtenção de uma suspensão de $2,5 \times 10^6$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

3.21.4 Determinação da CIM e CBM

Os poços das microplacas foram preenchidos com 100 μ L de TSB suplementado com 10% de SFB. Em seguida, acrescentou-se 100 μ L das soluções dos extratos, frações ou substâncias testes e realizou-se a diluição seriada até o décimo segundo ponto, o que possibilitou a obtenção de concentrações de 0,195 a 400 μ g/mL. Quando avaliou-se substâncias isoladas e padrões, os resultados de CIM e CBM foram convertidos para μ M. A cada poço adicionou-se 80 μ L de TSB suplementado com 10% de SFB para ajustar o volume. Utilizou-se como antibiótico padrão a claritromicina (Sigma) na concentração de 0,010 a 5 μ g/mL ($1,34 \times 10^{-5}$ a $6,7 \times 10^{-3}$ μ M). Para a realização da diluição seriada do antibiótico preencheu-se os doze pontos com 100 μ L de meio TSB suplementado e adicionou-se 100 μ L da solução de claritromicina para uso no primeiro poço da linha de controle do antibiótico padrão. Realizou-se a diluição seriada até o décimo segundo ponto, de onde se retirou 100 μ L para o controle de esterilidade do antimicrobiano. Em seguida, adicionou-se 80 μ L de caldo TSB suplementado e 20 μ L da suspensão da bactéria na concentração de $2,5 \times 10^6$ UFC/mL a cada poço, obtendo-se a concentração final de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL, correspondente a concentração de 5×10^4 UFC por poço). Como controles do experimento foram realizados o controle de esterilidade dos extratos vegetais, frações e substâncias, o controle de esterilidade do meio de cultura utilizado, o controle de crescimento bacteriano e o controle do solvente utilizado para solubilizar as amostras testadas (DMSO).

As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 72 horas sob condição de microaerofilia. Após o período de incubação, foram retiradas alíquotas de cada poço, utilizando-se a ponta de palitos esterilizados, e semeadas em placas de cultura contendo meio TSA suplementado com 5 % de sangue de carneiro para determinação da CBM.

3.21.5 Determinação dos resultados

Após 72 horas de incubação as placas foram retiradas da estufa e adicionou-se 20 µL da solução de resazurina na concentração de 0,02 % a cada poço. Foram considerados positivos para ação antibacteriana os poços que não apresentaram mudança de coloração de azul para rosa, indicando assim ausência de crescimento bacteriano. A menor concentração onde não se observou a mudança de coloração foi considerada a CIM. Foram consideradas como CBM as menores concentrações capazes de inibir definitivamente o crescimento bacteriano após a semeadura de alíquotas oriundas de cada poço em placas de cultura contendo ágar TSB suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado conforme descrito anteriormente para esse micro-organismo.

3.22 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *B. dracunculifolia* E DO EXTRATO DE *P. elliottii* NA ATIVIDADE DOS ANTIMICROBIANOS DE USO CLÍNICO

A metodologia utilizada para a avaliação foi a técnica de microdiluição em microplacas realizada para a determinação da CIM que foi descrita, para cada tipo de micro-organismo, nos itens anteriores. Os antimicrobianos utilizados como padrões para cada micro-organismo testado foram utilizados em diluição seriada como descrito anteriormente, porém associados a concentrações constantes de extratos e frações das espécies em estudo, na tentativa de se avaliar como concentrações sub-inibitórias de extratos e frações podem alterar a atividade dos antimicrobianos comerciais.

Antes da realização dos ensaios de associação obteve-se os valores de CIM para cada extrato e frações avaliadas no estudo, frente a cada um dos micro-organismos avaliados. Verificou-se quais extratos e frações apresentaram atividade inibitória a partir da determinação do valor de CIM e a partir desse valor calculou-se a quantidade de extrato ou fração que seria adicionado a cada poço contendo os antibióticos. As concentrações utilizadas na associação aos

antimicrobianos deveriam ser sub-inibitórias. Para tanto, dividiu-se o valor de CIM obtido para cada extrato e fração, frente cada micro-organismo, por quatro, utilizando-se um quarto da concentração que apresentou atividade, garantindo uma dose sub-inibitória (BETONI et al., 2006).

3.22.1 Procedimento experimental

Para penicilina e estreptomicina, a diluição seriada foi realizada da seguinte forma: dispensou-se em cada poço da série de 18 poços, 59 μL de caldo MH, pipetou-se 59 μL da solução de uso do antimicrobiano (penicilina 0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e estreptomicina 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e procedeu-se a diluição seriada até o 18º ponto, de onde foram retirados 59 μL para avaliação de esterilidade do antimicrobiano. Adicionou-se, a cada poço da série, 21 μL de uma mistura de caldo MH contendo o extrato ou fração a serem avaliados e 20 μL do inóculo, que foi preparado da mesma forma nos experimentos de determinação da CIM.

Para o antimicrobiano cetoconazol, a diluição seriada foi realizada até o 18º ponto de diluição. Para tanto, adicionou-se 186 μL de meio RPMI 1640 e 50 μL de solução de antifúngico na concentração de 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no primeiro ponto da série. Para cada um dos outros 17 pontos da diluição adicionou-se 118 μL de meio. Prosseguiu-se a diluição seriada retirando do primeiro ponto 118 μL . A diluição foi realizada até o décimo oitavo ponto do qual foram retirados 118 μL para serem utilizados no controle de esterilidade do antifúngico. Foram adicionados, a cada poço, 62 μL de uma mistura de meio RPMI 1640 adicionado do extrato ou fração a ser avaliado e 20 μL de inóculo.

Para o antimicrobiano fluconazol a diluição seriada foi realizada dispensando-se no primeiro ponto da diluição seriada 104 μL de meio RPMI 1640 e 16 μL de solução de antifúngico em concentração inicial de 6400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nos outros 11 pontos da curva adicionou-se 60 μL de meio RPMI 1640 e para a diluição seriada retiraram-se 60 μL do primeiro ponto da curva e prosseguiu-se até o décimo segundo ponto, do qual foram retirados 60 μL para serem utilizados como controle de esterilidade do antifúngico. Adicionou-se 20 μL de uma solução de meio RPMI 1640 contendo o extrato ou fração que foi avaliado e 20 μL da suspensão final de conídios, a cada ponto de diluição.

Para o antimicrobiano padrão claritromicina, a diluição seriada foi realizada até o décimo oitavo ponto. Para tanto, adicionou-se em todos os pontos da diluição 100 µL de meio TSB suplementado e pipetou-se 100 µL da solução de claritromicina (20 µg/mL) no primeiro poço da diluição. Realizou-se a diluição seriada até o décimo oitavo ponto, do qual retiraram-se 100 µL para o controle de esterilidade do antimicrobiano. Adicionou-se 80 µL a mistura de caldo TSB suplementado com o extrato ou fração a ser testado e 20 µL do inoculo a cada ponto.

As microplacas foram incubadas de acordo com cada micro-organismo avaliado e a verificação dos resultados foi realizada de acordo com a metodologia descrita nos itens que apresentam a metodologia para determinação da CIM.

3.23 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA

3.23.1 *Micro-organismos*

Mycobacterium tuberculosis H37Rv (ATCC 27294), *Mycobacterium kansasii* (ATCC 12478), *Mycobacterium avium* (ATCC 25291) adquiridas comercialmente. *Mycobacterium smegmatis* INCQS 00061 ATCC 700044 e *Mycobacterium bovis* INCQS 00062 BCG Moreau, doadas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e mantidos em coleção de cultura a -20°C no Laboratório de pesquisa em Microbiologia Aplicada- Universidade de Franca (LaPeMA-Unifran), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

3.23.2 *Determinação da CIM*

Para cada experimento, as culturas das micobactérias foram mantidas no meio sólido de Ogawa- Kudoh (LB Laborclin) em incubação a 37°C por 15 dias até se obter quantidade suficiente para uma alçada que correspondesse a 5,0 mg de peso seco micobacteriano. As colônias das micobactérias foram suspensas em tubos com pérolas de vidro e 500 µL de água destilada esterilizada, seguida de agitação em um agitador de tubos. Após agitação, retirou-se uma alíquota de 200 µL, a qual foi adicionada a 2 mL de meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase). Posteriormente, este tubo foi incubando por sete dias (no mínimo) à 37°C até obtenção de uma suspensão micobacteriana comparada à escala nº. 1 de McFarland (3×10^8 UFC/mL).

Para determinação da CIM foi utilizada a técnica de microdiluição em microplaca realizada de acordo com o método de REMA (*Resazurin Microtiter Assay Plate*) segundo Palomino et al (2002), utilizando a resazurina como revelador. Isoniazida foi utilizado como controle positivo nas concentrações de 0,015 a 1,0 µg/mL. Os extratos analisados foram solubilizados em 5% de DMSO e em caldo Middlebrook 7H9, e testados nas concentrações de 31,25 a 2000 µg/mL. As microplacas foram seladas com papel manilha e incubadas a 37°C. Após sete dias de incubação adicionou-se a solução de resazurina. A microplaca foi reincubada a 37°C por 24 horas, após esse período foi realizada a leitura final. A manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rosa, como presença de crescimento bacteriano.

3.24 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESINFETANTE BACTERICIDA

A avaliação da atividade bactericida foi realizada de acordo com o Procedimento Operacional Padronizado N° 65.3210.007 (INCQS, 2011), desenvolvido pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), com modificações.

3.24.1 *Micro-organismos*

A avaliação da atividade bactericida foi realizada frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Escherichia coli* (ATCC 11229), e mantidos em coleção de cultura a -20°C no laboratório de Farmacognosia- FCFRP/USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Nieve A. J. C. Furtado.

3.24.2 *Preparo dos cilindros carreadores*

Como agentes carreadores do experimento utilizou-se cilindros de aço inoxidável tipo 304, polidos, com 8 ± 1 mm (diâmetro externo) x 6 ± 1 mm (diâmetro interno) x 10 ± 1 mm (comprimento). Os cilindros foram fervidos em água destilada por 10 minutos e imersos em solução de hidróxido de sódio 1M, onde permaneceram por uma noite. Após esse período os cilindros foram lavados abundantemente com água de torneira e amostras de água de lavagem foram coletadas para verificação de pH. Quando o pH se apresentou neutro, os cilindros foram

rinsados com água destilada e distribuídos em tubos de ensaio com tampa, cobertos com água destilada e esterilizados por autoclavação a 121 °C por 20 minutos.

3.24.3 Preparo das culturas

Reconstitui-se uma ampola com o micro-organismo liofilizado, m bancada de fluxo laminar, com aproximadamente 0,5 mL de caldo nutriente D (*S. choleraesuis* e *E. coli*) e caldo soja triptica (*S. aureus* e *P. aeruginosa*). Transferiu-se uma alíquota de aproximadamente 0,2 mL para um tubo contendo o mesmo caldo e incubou-se por 48 horas a 37°C. Após o crescimento em caldo, as culturas foram transferidas para placas contendo ágar nutriente D ou ágar soja triptica e incubadas por 24 horas a 37 °C, para verificação da pureza das culturas.

A partir das culturas puras inoculou-se um tubo de 25 mm x 150 mm contendo 10 mL de caldo nutriente, para cada micro-organismo, utilizando-se uma alça de 4 mm de diâmetro cheia (1° repique). Incubou-se por 24 horas a 37°C e realizou-se mais dois repiques consecutivos, com intervalo de 24 horas entre eles, em 10 mL de caldo nutriente, utilizando-se alça de transferência de 4 mm e incubou-se por 24 horas a 37°C (2° e 3° repiques). A partir do 3° repique inoculou-se quatro tubos contendo 20 mL de caldo nutriente e o 4° repique foi incubado por 48 horas a 37°C.

3.24.4 Procedimento experimental

Ainda em bancada de fluxo laminar as culturas correspondentes ao 4° repique foram agitadas, exceto as culturas de *P. aeruginosa*, para as quais se removeu a parte líquida de crescimento sem danificar a película que se formou acima das culturas. A parte líquida das mesmas foi transferida para tubos esterilizados e procedeu-se a agitação dos mesmos. Após a agitação, as culturas permaneceram em repouso por 10 minutos. Antes de se utilizar as mesmas realizou-se um *pool* das culturas de cada um dos micro-organismos e distribuíram-se alíquotas de 20 mL em tubos esterilizados.

Transferiu-se 20 cilindros carreadores para tubos contendo 20 mL das culturas testes e os cilindros permaneceram submersos em contato com a cultura por 15 minutos. Após o período de contato, os cilindros foram retirados com o auxílio de uma alça carreadora e dispostos em posição vertical sobre uma placa de Petri contendo duas camadas de papel de filtro, não permitindo que os mesmos tombassem ou encostassem um no outro ou nas paredes da placa.

Com auxílio de alça flambada foram eliminadas bolhas que se formavam dentro dos cilindros. As placas foram fechadas e mantidas em estufa a 37°C por 40 minutos para possibilitar a secagem dos carreadores. As soluções desinfetantes a serem testadas foram distribuídas em tubos de ensaio esterilizados, no volume de 10 mL para cada tubo e os tubos foram mantidos a temperatura de 20 °C, até alcançarem a mesma temperatura.

Transferiu-se um cilindro seco para cada um dos tubos contendo a solução testada, com intervalo de 1 minuto entre cada transferência, o que permitiu a flambagem e resfriamento da alça de transferência. Os tubos foram agitados suavemente e mantidos em repouso à temperatura de 20°C por 10 minutos. Após o período de 10 minutos de contato com a solução desinfetante, os carreadores foram retirados da solução e transferidos para tubos contendo caldo nutriente, sendo estes denominados tubos de subcultura. Após 30 minutos de contato com o caldo dos tubos de subcultura os cilindros foram transferidos para uma nova série de tubos contendo caldo nutriente, denominados tubos de re-subcultura. Todos os tubos de subcultura e re-subcultura foram incubados a 37°C por 48 horas.

3.24.5 Controles

3.24.5.1 Contagem de bactérias viáveis nos cilindros carreadores

A determinação do número de UFC/carreador foi realizada somente para as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* conforme preconizado pelo protocolo. Para tal selecionou-se aleatoriamente um cilindro carreador contaminado e seco por 40 minutos à 37°C. Transferiu-se o cilindro para um tubo de ensaio contendo caldo Letheen e o tubo foi acondicionado dentro de um béquer contendo água, até o mesmo nível do meio de cultura que se encontrava dentro do tubo. O béquer foi colocado em um banho de ultrassom, mantendo-se o nível da água do béquer no mesmo nível da água do banho de ultrassom. O béquer foi colocado no banho manualmente, evitando-se o contato do mesmo com o fundo do aparelho. O conjunto foi submetido a sonicação por 1 minuto. Após a sonicação os tubos contendo os cilindros foram agitados por 1 minuto e realizaram-se as diluições seriadas em 9 mL de solução tampão fosfato diluída. Semeou-se 0,1 mL das diluições, em duplicata, em ágar soja triptica pela técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e procedeu-se a contagem das colônias.

Para o cálculo de UFC/mL empregou-se a seguinte equação:

$$UFC/mL = \frac{(m\u00e9dia\ UFC\ dil.\ 10^{-x}) + (m\u00e9dia\ UFC\ dil.\ 10^{-y}) + (m\u00e9dia\ UFC\ dil.\ 10^{-z})}{10^{-x} + 10^{-y} + 10^{-z}}$$

Foram empregadas as contagens de 0 a 300 para os c\u00e1lculos, registrando-se contagens acima de 300 como MNC (muito numerosa para contagem). Ajustou-se as dilui\u00e7\u00f5es de acordo com o volume semeado (0,1 mL), multiplicando por 10. Para o c\u00e1lculo de UFC/carreador multiplicou-se o n\u00famero de UFC/mL pelo volume de caldo Lethen usado na sonica\u00e7\u00e3o de cada cilindro carreador (10 mL). Calculou-se o Log_{10} do valor de UFC/mL obtido para cada carreador, obtendo-se assim o valor de densidade microbiana por carreador. O valor de log deve ser de pelo menos 6,0 (correspondente a uma densidade geom\u00e9trica m\u00e9dia de 1×10^6) para que o ensaio seja considerado v\u00e1lido.

3.24.5.2 Viabilidade do meio de subcultura

Adicionou-se 1 cilindro carreador contaminado a um tubo contendo o meio de subcultura utilizado, o qual foi incubado conforme j\u00e1 descrito para o experimento e no qual ocorrer crescimento do micro-organismo teste.

3.24.5.3 Esterilidade do meio de subcultura

Incubou-se um tubo contendo o meio de subcultura utilizado, conforme j\u00e1 descrito e para o qual n\u00e3o deve ocorrer crescimento microbiano.

3.24.5.4 Esterilidade dos cilindros carreadores

Adicionou-se um cilindro esterilizado do lote que foi empregado no experimento a um tubo contendo o meio de subcultura, o qual foi incubado conforme j\u00e1 descrito para o experimento e para o qual n\u00e3o deve ocorrer crescimento microbiano.

3.24.5.5 Meios de cultura utilizados no experimento

Caldo nutriente:

Obtido comercialmente (HIMEDIA) e preparado de acordo com as especificações do fabricante.

Ágar nutriente:

O caldo nutriente foi preparado conforme especificações do fabricante adicionando-se 2% de ágar bacteriológico.

- Aqueceu-se até a completa dissolução do ágar, autoclavou-se em Autoclave Vertical Phoenix, modelo AV75, por 15 minutos a 121 °C e distribuiu-se em placas de Petri para solidificação.

Caldo nutriente D:

Extrato de carne – 3,0 g

Peptona – 5,0 g

Água destilada – 1000 mL

Agitou-se a mistura até completa dissolução, a qual foi autoclavada durante 15 minutos a 121 °C.

Ágar nutriente D:

Extrato de carne – 3,0g

Peptona – 5,0 g

Ágar – 15,0 g

Água destilada – 1000 mL

- Aqueceu-se até fervura para completa dissolução do ágar, submeteu-se à autoclave durante 15 minutos a 121°C e distribuiu-se em placas de Petri para solidificação.

Caldo Lethen (caldo nutriente com lecitina e polissorbato 80)

Solução A

Lecitina – 0,7g

Polissorbato 80 – 5,0 g

Água destilada – 400 mL

Ferveu-se até ficar translúcido

Solução B

Prepararam-se 600 mL de caldo nutriente de acordo com as instruções do fabricante.

Juntaram-se as soluções A e B e ferveu-se durante 10 minutos.

Soluções utilizadas no experimento:

Solução tampão fosfato estoque

Fosfato mono-potássico – 34 g

Água destilada - 1000 mL

- Dissolveu-se o fosfato mono-potássico em 500 mL de água purificada. Ajustou-se o pH a 7,2 \pm 0,5 com hidróxido de sódio 1M e completou-se o volume para 1000 mL.

Solução tampão fosfato diluída

Solução tampão fosfato estoque – 1,25 mL

Água destilada – 1000 mL

- Autoclavou-se durante 20 minutos a 121 °C.

3.25 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESINFETANTE FUNGICIDA

A avaliação da atividade fungicida foi realizada de acordo com o Procedimento Operacional Padronizado N° 65.3210.011 (INCQS, 2011), desenvolvido pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), com modificações.

3.25.1 Micro-organismo

A avaliação da atividade fungicida foi realizada frente ao micro-organismo *Tricophyton mentagrophytes* (ATCC 9533), obtido mediante doação do INCQS – FIOCRUZ, e mantido em coleção de cultura a -20°C no laboratório de Farmacognosia- FCFRP/USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Niede A. J. C. Furtado.

3.25.2 Preparação da suspensão de conídios

Reconstituiu-se, em bancada de fluxo laminar, uma ampola contendo o micro-organismo liofilizado com aproximadamente 0,5 mL de água purificada estéril, aguardou-se a reidratação e transferiu-se alíquotas de aproximadamente 0,1 mL para três tubos contendo ágar glicosado a 2%, pH 6,2. Observou-se a pureza das culturas e as mesmas foram mantidas em ágar glicosado a 2%, pH 6,2.

O micro-organismo foi semeado no centro de dez placas de Petri contendo ágar glicosado a 2,0% pH 6,2 ± 0,1 e as placas foram incubadas a 30 °C por 10 dias. Após o período de incubação procedeu-se a remoção da massa micelial da superfície do meio de cultura e transferiu-se a mesma para um Erlenmeyer contendo pérolas de vidro e 25 mL de solução de cloreto de sódio 0,85%. Procedeu-se a uma vigorosa agitação até obtenção de uma suspensão, a qual foi filtrada através de três camadas de gaze estéril para a remoção das hifas. A determinação do número de conídios/mL foi realizada por contagem de conídios em microscópio ótico utilizando-se câmara de Neubauer. A partir dessa suspensão preparou-se a suspensão utilizada nos ensaios, a qual deveria conter uma concentração de 5×10^6 conídios/mL em solução de cloreto de sódio 0,85%.

3.25.3 Procedimento experimental

A solução teste foi distribuída em três tubos estéreis de 25 mm x 150 mm, em volume final de 5 mL por tubo. Os tubos contendo a solução teste, bem como a suspensão conidial, que foi utilizada no procedimento, foram mantidos à temperatura de 20°C. Transferiu-se 0,5 mL da suspensão de conídios para cada um dos tubos testes, respeitando-se o tempo de 1 min de intervalo entre cada adição. Os tubos foram agitados e mantidos em repouso à temperatura de 20°C. Após 5 min de contato entre a solução teste e a suspensão conidial procedeu-se a retirada de uma alçada (utilizando alça de transferência de 4 mm) do tubo contendo a mistura e esta foi semeada em tubo de subcultura contendo 10 mL de caldo glicosado. O mesmo procedimento foi repetido para os outros dois tubos que continham a mistura da solução testada e os conídios, respeitando-se os intervalos estipulados. O mesmo procedimento foi repetido após os tempos de contato de 10 e 15 min. Para eliminar riscos de resultados falsos negativos devido a possível ação fungistática, realizou-se uma segunda subcultura retirando-se uma alçada de cada um dos tubos das subculturas iniciais transferindo-as para outros tubos contendo 10 mL do meio de

subcultura, identificando os mesmos como re-subcultura. Os tubos de subcultura foram incubados por 10 dias a 30°C.

3.25.4 Controles

3.25.4.1 Controle da suspensão conidial teste determinando a sua resistência ao fenol

A partir de solução de fenol 5% (1:20) preparam-se soluções 1:60 e 1:70 em água purificada estéril. Transferiu-se 5 mL de cada uma das soluções de fenol para três tubos de ensaio com tampa. Adicionou-se a cada um dos tubos 0,5 mL da suspensão conidial utilizada no teste. Após os tempos de contato de 5, 10 e 15 minutos retirou-se uma alçada das misturas de solução de fenol e suspensão conidial e transferiu-se as mesmas para tubos contendo meio de subcultura. Todos os tubos de subcultura foram incubados como o descrito para o procedimento experimental, sendo que os conídios deveriam sobreviver à exposição à solução de fenol 1:70. Porém, não deveriam sobreviver quando expostos a solução de fenol 1:60, após 10 min de contato.

3.25.4.2 Controle de viabilidade do meio de subcultura

Inoculou-se o meio de subcultura com a suspensão teste utilizando alça de transferência com 4 mm de diâmetro e incubou-se conforme descrito para o experimento.

3.25.4.3 Controle de esterilidade do meio de subcultura

Incubou-se um tubo do meio de subcultura como descrito no item anterior, não devendo ocorrer crescimento microbiano.

3.25.4.4 Controle de esterilidade da água utilizada para o preparo das soluções de fenol

Adicionou-se 0,2 mL da água purificada estéril a um tubo contendo o meio de subcultura e incubou-se conforme descrito para o experimento.

3.25.5 Meios de cultura utilizados no experimento

Ágar glicosado a 2% pH 6,2

Polipeptona (Difco™ e BBL™.) – 10g

Glicose – 20 g

Ágar – 20g

Água destilada – 1000 mL

Aqueceu-se a mistura até fervura e dissolução total do ágar. Ajustou-se o pH a 6,2 e submeteu-se à autoclave durante 20 min a 121 °C. Após autoclavação distribuiu-se o meio em placas de Petri esterilizadas para solidificar.

Caldo glicosado a 2%

Polipeptona – 10g

Glicose – 20g

Água destilada – 1000 mL

Agitou-se até completa dissolução e ajustou-se o pH a 6,2. Distribuiu-se em porções de 10 mL em tubos de ensaio com tampa, os quais foram autoclavados durante 20 min a 121 °C.

3.25.6 Soluções utilizadas no experimento

Solução de fenol 5% (peso/volume) estoque

Fenol – 50 g

Água destilada q.s.p. – 1000 mL,

Padronizado com solução de KBr – KBrO₃ a 0,0167M.

3.26 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DA SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA DO EXTRATO DE *B. dracunculifolia* A 0,2% EM ÁLCOOL 40 °GL

O método empregado para preparo das culturas e desenvolvimento do teste seguiu as normas da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) adaptado para as normas brasileiras pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz (ROMÃO et al, 1991).

3.26.1 *Micro-organismos*

Mycobacterium smegmatis INCQS 00061 PRD# 1 e *Mycobacterium bovis* (BCG) cepa Moraeu INCQS 00062, doadas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e mantidos em coleção de cultura a -20°C no Laboratório de pesquisa em Microbiologia Aplicada- Universidade de Franca (LaPeMA-Unifran), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

A avaliação da atividade micobactericida foi realizada em duas etapas com dois micro-organismos diferentes.

A solução desinfetante foi avaliada frente *M. smegmatis*, como um teste presuntivo da atividade micobactericida. No caso da solução ter apresentado alguma efetividade frente a esses micro-organismos, a mesma foi avaliada frente a *M. bovis* determinado como teste confirmatório para a atividade micobactericida. A solução desinfetante só pode ser considerada micobactericida quando se apresentar efetiva frente aos dois micro-organismos.

3.26.2 *Preparo dos cilindros carreadores*

Para a realização dos testes utilizou-se como carreadores microbianos cilindros de porcelana com as dimensões de 8 ± 1 mm (diâmetro externo) x 6 ± 1 mm (diâmetro interno) x 10 ± 1 mm (comprimento). Os cilindros foram previamente lavados com Triton X 100 e água destilada, secos em estufa e submetidos a esterilização em estufa a 180 °C por duas horas.

3.26.3 *Preparo das culturas teste para o teste presuntivo*

Para o preparo das culturas teste o micro-organismo *M. smegmatis* foi inoculado em tubos contendo 10 mL de caldo Proskauer-beck modificado e os tubos foram incubados a 37°C por sete dias. Após o período de incubação adicionou-se 1,5 mL de solução de gelatina a 2% a cada tubo e as culturas foram transferidas para frasco do tipo Erlenmeyer contendo pérolas de vidro e homogeneizadas com o auxílio de agitador. Ajustou-se o inóculo para o valor de 20% de transmitância, no comprimento de onda de 650 nm. Para calibração do aparelho utilizou-se meio de cultura Proskauer-beck modificado esterilizado.

3.26.4 Avaliação da atividade micobatericida presuntiva

Para a realização do teste transferiram-se 20 cilindros de porcelana para 20 mL de suspensão de *M smegmatis* e os cilindros foram mantidos em contato com a suspensão por 15 min. Após esse período, os cilindros foram retirados da suspensão e posicionados em placa de Petri contendo papel de filtro esterilizado e incubados em estufa a 37°C por 30 min, para secagem.

Após a secagem os cilindros foram transferidos para tubos contendo 10 mL da solução teste, com intervalos de 1 min entre cada transferência, obtendo-se ao final 20 tubos. Os cilindros foram mantidos em contato com a solução teste por 30 min. Após esse período, os cilindros foram retirados da solução e transferidos para tubos contendo 10 mL de meio Proskauer-beck modificado, sendo que esses tubos foram denominados tubos de subcultura. Os cilindros foram mantidos nesse meio por 20 min e, após esse período, procedeu-se a transferência dos cilindros para novos tubos contendo o mesmo meio de cultura, sendo que esses tubos foram denominados tubos de re-subcultura. Os tubos foram agitados e incubados a 37°C por 12 dias. O resultado final se apresenta por presença ou ausência de turvação dos meios de subcultura. O sanitizante deve ser capaz de eliminar os micro-organismos nos 20 cilindros testados.

3.26.5 Preparo das culturas para o teste confirmatório

Para o preparo das culturas teste o micro-organismo *M. Bovis* foi inoculado em tubos contendo 10 mL de caldo Proskauer-beck modificado e os tubos foram incubados a 37°C por um período de 21 a 25 dias. Após o período de incubação adicionou-se às culturas 1 mL de solução a 0,1% de Tween 80 em solução de cloreto de sódio a 0,9%. As culturas foram transferidas para Erlenmeyer esterilizado contendo pérolas de vidro e homogeneizadas com auxílio de um agitador. O homogeneizado foi diluído com o meio de cultura inicial até obtenção de uma suspensão que apresentou 20% de transmitância em leitura realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 650 nm.

3.26.6 Avaliação da atividade micobatericida confirmatória

Para a realização dos ensaios transferiram-se 10 cilindros esterilizados para 10 mL da suspensão de *M. bovis* e os cilindros foram mantidos em contato com a suspensão por 15 min.

Após o período de exposição, os cilindros foram transferidos para placas de Petri contendo papel de filtro esterilizado e incubados em estufa a 37°C por 30 min, para secagem.

Após a secagem, os cilindros foram transferidos para tubos contendo 10 mL da solução desinfetante a ser avaliada com intervalos de 1 min entre cada transferência, obtendo-se ao final 10 tubos. Os cilindros foram mantidos em contato com a solução por 30 min e, após o tempo de exposição, estes foram retirados da solução teste e transferidos para tubos de subcultura contendo 10 mL de soro de cavalo.

Os tubos foram agitados e os cilindros foram transferidos para tubos contendo 20 mL de meio Proskauer-beck modificado, denominados tubos de re-subcultura. Retiraram-se alíquotas de 4 mL dos tubos contendo o soro de cavalo utilizado para rinsar os carreadores e semearam-se 2 mL em tubo contendo caldo Middelbrook 7H9 B e 2 mL em tubo contendo meio de Kirchner. Todos os tubos foram incubados em estufa a 37°C por 60 dias. Incubaram-se também tubos contendo os meios de cultura e o soro de cavalo como controles de esterilidade. Os resultados foram descritos como positivos quando houve crescimento e negativos na ausência de crescimento bacteriano.

3.27 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESINFETANTE ESPOROCIDA

A avaliação da atividade esporocida foi realizada de acordo com o Procedimento Operacional Padronizado N° 65.3210.005 (INCQS, 2011), desenvolvido pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), com modificações.

3.27.1 *Micro-organismos*

A avaliação da atividade esporocida foi realizada frente aos micro-organismos *Bacillus subtilis* (ATCC 19659) e *Clostridium sporogenes* (ATCC 3584), ambos obtidos mediante doação do INCQS – FIOCRUZ, e mantidos em coleção de cultura a -20°C no laboratório de Farmacognosia- FCFRP/USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Nieve A. J. C. Furtado

3.27.2 *Preparação dos cilindros carreadores*

Como carreadores bacterianos foram utilizados cilindros de porcelana com 8 mm (de diâmetro externo), 6 mm (de diâmetro interno) e 10 mm de comprimento. Os cilindros foram

mergulhados em uma solução de extram: água (1:1) por uma hora. Após esse período os cilindros foram enxaguados abundantemente com água corrente e rinsados cinco vezes com água purificada em aparelho MILLIE-Q. Os cilindros foram dispostos em placas de Petri contendo duas camadas de papel de filtro e foram esterilizados durante 20 min a 121 °C.

3.27.3 *Preparação das culturas teste*

3.27.3.1 *Clostridium sporogenes*

Reconstituiu-se uma ampola contendo o micro-organismo liofilizado com aproximadamente 0,5 mL de meio reforçado para *Clostridium* e transferiu-se uma alíquota de aproximadamente 0,2 mL para um tubo contendo 10 mL do mesmo caldo, o qual foi incubado por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação foram semeados três tubos contendo extrato de solo, carne e ovo. Os tubos foram incubados por 72 horas a 37 °C em câmara de anaerobiose, Whitley (modelo DG250), em atmosfera de 85% de nitrogênio, 10% de dióxido de carbono e 5% de gás hidrogênio, na temperatura controlada de 37°C. Após esse período verificou-se a pureza das culturas e no caso de não apresentarem contaminação, os tubos foram guardados em geladeira para servirem de cultura estoque.

A partir da cultura estoque foram semeados 25 tubos contendo 15 mL de meio extrato de solo, ovo e carne e incubados por 72 horas a 37 °C em câmara de anaerobiose. Após o período de incubação as culturas foram filtradas através de funil contendo três camadas de gaze estéril. O filtrado foi distribuído em seis tubos de 25 mm x 150 mm e mais 10 mL em dois tubos de mesma medida para servirem de reserva e para os controles.

3.27.3.2 *Bacillus subtilis*

O conteúdo da ampola foi reconstituído com 0,5 mL de caldo nutriente D e, em seguida, foi transferido 0,2 mL para dois tubos contendo 10 mL de caldo nutriente D, os quais foram incubados por 24 horas a 37°C. A partir desse inóculo, uma alçada foi semeada em placas de Petri contendo ágar nutriente D e a placa foi incubada por 24 horas a 37 °C. A partir dessa placa avaliou-se a pureza do inóculo e uma colônia isolada foi semeada em três tubos contendo ágar nutriente D inclinado. As culturas foram incubadas por 18-24 horas a 37 °C. Após esse período os tubos foram guardados em geladeira e foram utilizados como cultura estoque para os experimentos.

A partir da cultura estoque, inoculou-se 25 tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo cada um 10 mL de caldo nutriente extrato de solo e as culturas foram incubadas em estufa por 72 horas a 37 °C.

Com o auxílio de um bastão de vidro, procedeu-se à maceração em Erlenmeyer até a ruptura da película que se formou sobre a cultura. Procedeu-se a filtração em funil contendo três camadas de gaze estéril e distribuiu-se 20 mL do filtrado em cada um dos seis tubos (25 mm x 150 mm) e mais 10 mL em tubos com a mesma medida para os controles.

3.27.4 Procedimentos experimentais realizados para cada micro-organismo

Os cilindros secos e esterilizados foram transferidos para os tubos de ensaio contendo 20 mL do filtrado da cultura e os tubos foram agitados e deixados em repouso por 15 minutos a 20 °C. Após o tempo de contato, os cilindros foram transferidos com auxílio de uma alça estéril para placas de Petri forradas com duas camadas de papel de filtro para proporcionar a drenagem do líquido. As placas foram lacradas com parafilm e transferidas para estufa a 37°C, por 24 horas.

As soluções desinfetantes foram distribuídas em tubos em volume de 10 mL por tubo, sendo os tubos submetidos a repouso em temperatura ambiente 20°C por 10 minutos. Transferiu-se 1 cilindro contaminado para cada um dos tubos contendo a solução a ser testada, com intervalos de 1 min entre cada tubo. Após os períodos de contato, os cilindros foram retirados mantendo-se o tempo de intervalo de 1 minuto entre cada um deles e foram transferidos para tubos de subcultura contendo meio tioglicolato fluido. Após a transferência de todos os cilindros para os meios de subcultura, os mesmos foram transferidos para meios de re-subcultura para evitar uma possível atividade residual da solução desinfetante testada. Os tubos foram incubados a 37°C e observados por um período máximo de 21 dias.

3.27.5 Controles

3.27.5.1 Controle da cultura teste

Foram colocados em um tubo de ensaio 10 mL da solução de ácido clorídrico 2,5 N e o tubo foi mantido a 20°C por 10 minutos. Após esse período cilindros contaminados e secos foram adicionados ao tubo, o qual foi agitado e os cilindros foram sendo retirados após o tempo de 2, 5, 15 e 20 minutos de contato com a solução. Cada cilindro foi transferido para um tubo

de subcultura contendo o meio de tioglicolato fluido e após todas as transferências, os mesmos foram transferidos para tubos contendo o mesmo meio de cultura e denominados tubos de re-subcultura. Todos os tubos de subcultura foram incubados a 37°C, por no máximo 21 dias. Os esporos deveriam resistir ao tempo de exposição de 2 min ou mais, podendo resistir até o tempo de 20 min de exposição.

3.27.5.2 Controles de esterilidade dos cilindros carreadores

Transferiu-se um cilindro esterilizado para um tubo contendo o meio tioglicolato fluido, no qual não deveria ocorrer crescimento.

3.27.5.3 Controle de esterilidade do meio de subcultura

Incubou-se um tubo contendo o meio de tioglicolato fluido, no qual também não deveria ocorrer crescimento.

3.27.6 Meios de cultura utilizados

Caldo nutriente – Extrato de solo

Preparo do extrato de solo

Dissolveram-se 500 g de solo de jardim em 1000 mL de água purificada. Filtrou-se várias vezes através de papel de filtro e ajustou-se o volume e verificou-se o pH $\geq 5,2$.

Ferveu-se a mistura por 20 min, ajustou-se o volume para 1000 mL e o pH a 6,9 a 25 °C. Filtrou-se através de papel de filtro, distribuiu-se porções de 10 mL por tubo e autoclavou-se durante 20 min a 121 °C.

Meio extrato de solo, ovo e carne

Músculo – 454 g

Clara de ovo – 6 ovos

Carbonato de cálcio – 5,0 g

Preparação do meio de cultura

Extrato de carne – 5,0g

Cloreto de sódio – 5,0g

Digesto péptico de carne – 10,0 g

Extrato de solo – 1000 mL

Misturaram-se todos os componentes do meio e distribuiu-se 1,5 g por tubo de ensaio acrescido de 15 mL de extrato de solo. Autoclavou-se durante 20 min a 121°C.

Meio tioglicolato fluido

Preparado a partir do meio desidratado adquirido comercialmente (Fluka-Sigma-Aldrich) utilizando-se água destilada.

Meio reforçado para clostridio

Preparado a partir de meio desidratado adquirido comercialmente (Fluka-Sigma-Aldrich) utilizando-se água destilada.

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS PARTE I – ESTUDO FITOQUÍMICO

4.1 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE *B. dracunculifolia* EM HSCCC

A partir do processo de fracionamento do extrato de *B. dracunculifolia* em HSCCC obteve-se várias frações, nas quais por análise em HPLC analítico observou-se que algumas se apresentaram muito menos complexas do que o extrato bruto, e algumas com uma ou duas substâncias majoritárias em valor de área. A partir dessa análise, algumas frações foram selecionadas para serem submetidas a purificação em HPLC preparativo, o que possibilitou o isolamento de três componentes. Após o isolamento, as substâncias foram solubilizadas em solventes deuterados e submetidas às análises de RMN de ^1H e ^{13}C .

Na Figura 6 estão inseridos os cromatogramas do extrato bruto de *B. dracunculifolia* e das frações que foram submetidas ao processo de purificação para o isolamento das substâncias. Observa-se que a utilização do HSCCC propiciou o fracionamento com a redução da complexidade da mistura nas frações obtidas.

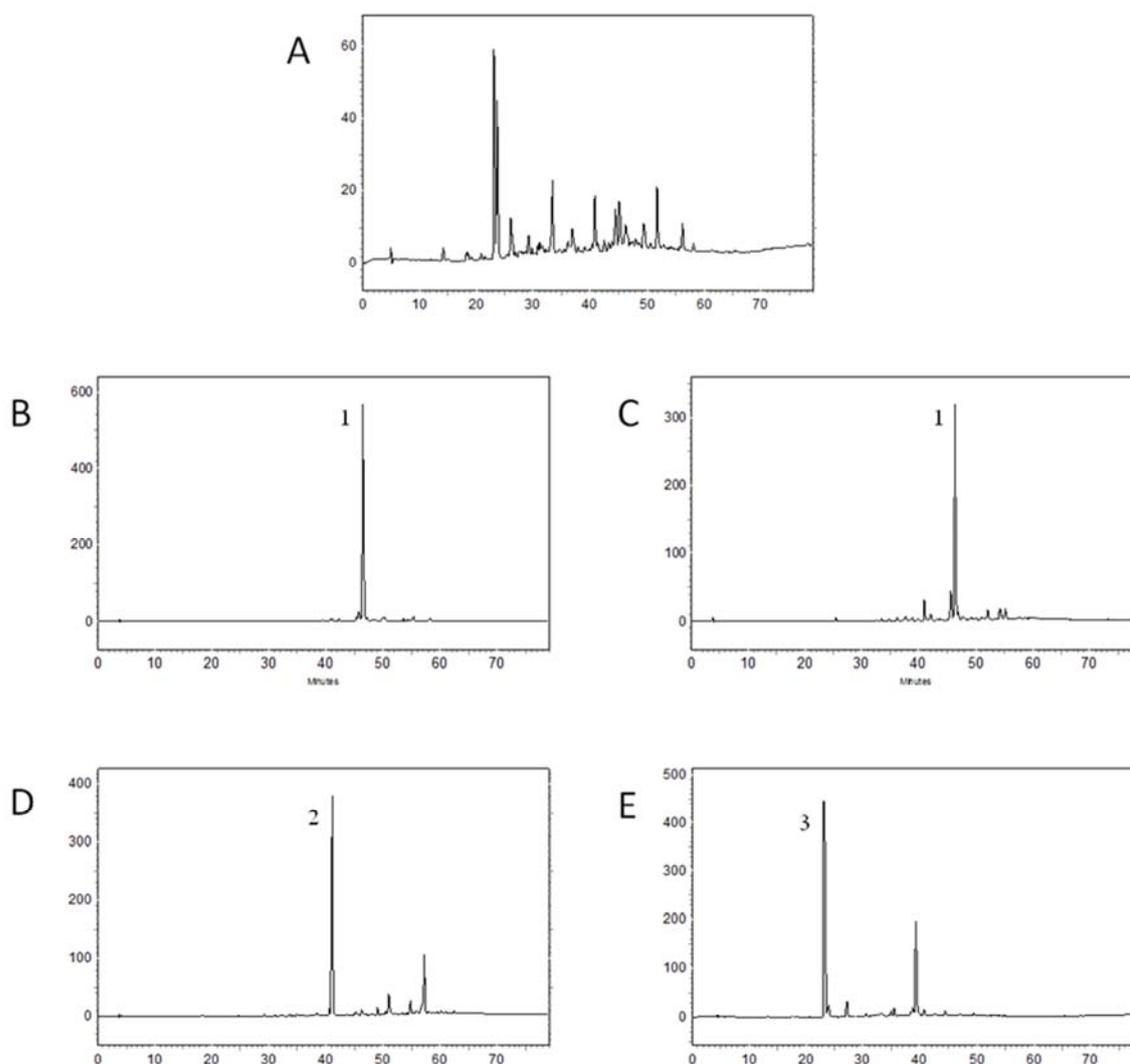


Figura 6. Perfis cromatográficos obtidos em CLAE-UV-DAD (300 nm) do extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* (A) e das frações BD31-36 (B), BD37-43 (C) das quais foi isolado o composto 1. Da fração BD43-46 (D) da qual foi isolado o composto 2 e da fração BD48-53 (E) da qual foi isolado o composto 3. Utilizou-se coluna C18 (4,6 mm ID x 25 mm). Fase móvel : água acidificada (Ác. Acético 0,1%): MeOH; eluição em modo gradiente 20% - 100% MeOH em 70 min; vazão: 0,8 mL/ min.

A cromatografia de contracorrente (CCC) é uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido, na qual a fase estacionária é retida no aparelho sem a necessidade de utilização de matriz sólida e a fase móvel é bombeada através da mesma. Pelo processo de rotação possibilita-se a mistura entre as fases e a distribuição dos componentes entre as mesmas. A CCC tem se mostrado bastante útil no isolamento e purificação de produtos de origem natural, principalmente para substâncias de média a alta polaridades, que apresentam maior dificuldade para serem isoladas quando submetidas ao fracionamento por técnicas cromatográficas convencionais. Dentre algumas vantagens que a CCC apresenta quando se compara a técnica

aos métodos cromatográficos que utilizam fase estacionária sólida, pode-se citar: versatilidade, recuperação de toda a amostra injetada, eficiência em separação, rapidez, uso reduzido de solventes, previsibilidade e reprodutibilidade (COSTA, 2009; MARSTON & HOSTETTMAN, 2006; PAULI et al., 2008; KUBO, 1991; LEITÃO, 2005; MARSTON & HOSTETTMAN, 1994; FISHER et al., 1991; BERTHOD, 1991).

Técnicas cromatográficas convencionais utilizam apenas uma fase para eluir analitos de matrizes adsorptivas ou de suportes sólidos revestidos com fase líquida. Em contraste, a CCC utiliza sistema de solventes, onde uma das fases é usada como fase estacionária e a outra como fase móvel. A utilização de sistema de solventes composto por duas fases líquidas permite a utilização de grande número de solventes em diversas combinações possíveis. Dados da literatura sugerem várias alternativas para se iniciar a escolha do sistema de solventes apropriado a cada tipo de amostra (PAULI et al., 2008; SEGER et al., 2006; ITO, 2005; FOCAULT e CHEVOLOT, 1998; FOCAULT, 1994).

O sistema pode conter de três a cinco solventes, devendo ser preferencialmente bifásico. A amostra deve apresentar-se estável e solúvel no sistema e o tempo de decantação entre as fases deve ser inferior a 30 segundos, propiciando assim maior retenção da fase estacionária dentro do aparelho. No presente estudo a proporção (v/v) adequada dos solventes foi 1:1/0,6:0,4 (hexano: AcOEt (fase superior/ orgânica): MeOH:água destilada (fase inferior/aquosa), a qual apresentou tempo de decantação de 14 s e a proporção do volume entre a fase móvel e estacionária foi de 1,2:1,8 (fase orgânica: fase aquosa). Mesmo que a proporção 1:1 do volume entre as fases seja considerada a ideal, a proporção obtida permitiu o consumo total da fase móvel, mantendo-se ainda a vantagem de economia de solventes. Estudo para isolamento de flavonoides utilizando CCC e outras técnicas cromatográficas (cromatografia de filtração em gel e CLAE) evidenciou as vantagens da CCC devido sua versatilidade, eficiência, rapidez, previsibilidade e reprodutibilidade (COSTA, 2009).

Outro fator de grande relevância para a utilização da CCC é o coeficiente de partição, que é a relação de soluto distribuído entre as duas fases do sistema de solventes em equilíbrio, o qual é expresso pela quantidade de soluto na fase móvel dividido pela quantidade de soluto na fase estacionária. Apesar de ser uma etapa importante da metodologia de CCC, o coeficiente de partição não foi calculado no presente estudo, visto que não havia somente uma substância de interesse a ser isolada e, como a amostra utilizada se apresentou muito complexa nas análises

por CCDC e CLAE, optou-se por analisar as duas fases por CCD o que permitiu avaliar a distribuição relativa total de solutos entre as mesmas.

O rendimento dos compostos isolados por CCC pode ser maior caso não se utilize a etapa em CLAE-PREP. Porém, as frações não apresentaram alto rendimento e mesmo apresentando menor complexidade do que o extrato bruto de *B. dracunculifolia*, elas não se apresentavam puras e a utilização de CLAE-PREP foi imprescindível. Mesmo com baixo rendimento das frações, a metodologia de CCC apresentou-se eficiente, principalmente quando avaliada frente aos fatores de economia de solventes.

4.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO BD-1

O composto BD 1 (Figura 7) (6 mg) foi isolado das frações BD 31-36 (23 mg) e BD 37-43 (15 mg). A substância apresentou-se como um pó amorfo amarelo claro, solúvel em metanol deuterado, o qual foi o solvente escolhido para a realização das análises de RMN.

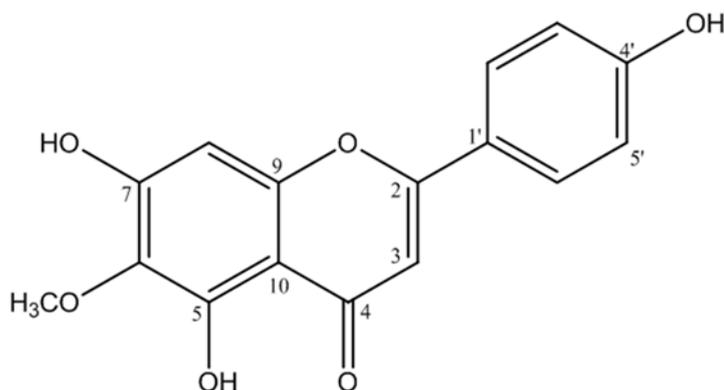


Figura 7. Estrutura química do composto BD-1.

A análise do espectro de RMN de ^1H permitiu a visualização de um simpleto em $\delta 6,61$, sinais para um grupo metoxílico em $\delta 3,88$, um simpleto em $\delta 6,57$ [s, 1H] e dois dupletos em $\delta 6,93$ [$J = 8,9$; 2H] e $\delta 7,86$ [$J = 8,9$; 2H] atribuídos aos hidrogênios do anel B *p*-dissubstituído.

As análises dos espectros de HMBC indicam que o simpleto em $\delta 6,57$ correlaciona-se com os carbonos $\delta 154,6$ e $\delta 158,7$ atribuindo-se esse sinal ao hidrogênio na posição 8. A correlação do simpleto em $\delta 6,61$ com os carbonos $\delta 184,3$ e $\delta 166,4$ permitiu atribuir esse sinal ao hidrogênio na posição 3, identificando a substância como uma flavona. O sinal em $\delta 3,88$ atribuído ao grupo metoxílico correlaciona-se unicamente com o carbono em $\delta 132$, sendo que esse carbono sp^2 ligado ao grupo metoxílico encontra-se blindado devido ao efeito doador de elétrons dos grupamentos hidroxílicos adjacentes, o que permitiu a atribuição do grupamento metoxílico na posição 6 do anel A. Os dados obtidos experimentalmente condizem com os descritos na literatura para a flavona hispidulina (4',5,7-trihidroxi-6-metoxiflavona) (MOREIRA et al., 2003). Os dados obtidos experimentalmente e os obtidos na literatura estão

apresentados na Tabela 14. Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HMQC e HMBC estão apresentados no Apêndice.

Tabela 14. Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC obtidos do composto BD-1 (hispidulina) e dados de ^1H da literatura.

Posições	δ H (ppm) [integral; multiplicidade; <i>J</i> (Hz)]	δ C (ppm) HMQC	HMBC	δ H (ppm) [integral; multiplicidade; <i>J</i> (Hz)]*
2		166,4		
3	6,61 [1, s]	103,4	C- 2, C- 4, C – 10, C -1'	6,40 [1,s]
4		184,3		
5		154,6		
6		132,8		
7		158,7		
8	6,57 [1, s]	95,3	C -4, C- 6, C - 7, C -9 ,C-10	6,48 [1,s]
9		154,6		
10		105,8		
1'		123,2		
2'	7,86 [2, d, 8.9]	129,4	C-2, C- 4'	7,75 [2,d, 9,0]
3'	6,93 [2, d, 8.9]	117,0	C -1', C - 4'	6,82 [2,d, 9,0]
4'		162,7		
5'	6,93 [2, d, 8.9]	117,0	C- 1', C - 4'	6,82 [2,d, 9,0]
6'	7,86 [2, d, 8.9]	129,4	C -2, C- 4'	7,75 [2,d, 9,0]
OCH3	3,88 [3, s]	60,9	C -6	4,00 [3, s]

*Dados obtidos para composto hispidulina (HURABIELLE et al., 1982).

4.3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO BD-2

O composto BD-2 (6 mg) foi isolado a partir da fração BD43-46 (45 mg). A substância apresentou-se como um pó branco amorfo, solúvel em MeOH deuterado, sendo esse o solvente de escolha para as análises de RMN.

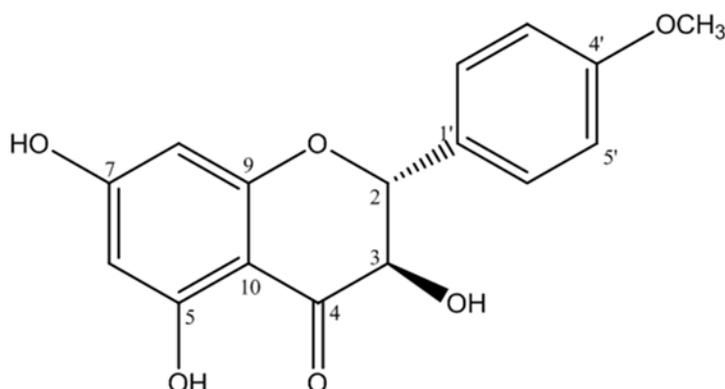


Figura 8. Estrutura química do composto BD-2.

A análise de RMN de ^1H permitiu a visualização de dois dupletos em δ 5,02 [d; $J= 11,6$, 1H] e δ 4,55 [d, $J= 11,6$, 1H], atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-2 e H-3 do anel C. Pode-se observar também a presença de dois dupletos em δ 5,93 [d; $J= 2,1$; 1H] e δ 5,89 [d; $J= 2,1$; 1H], que foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios aromáticos H-8 e H-6 do anel A, orientados em meta.

Aos hidrogênios do anel B foram designados os sinais de dois duplo dupletos em δ 7,45 [dd, $J= 8,8$ e 2; 2H] e em δ 6,97 [dd, $J=8,8$ e 2; 2H]. Pode-se verificar também um sinal em δ 3,84, integrado para 3H, que foi atribuído ao grupo metoxílico.

Os dados obtidos experimentalmente condizem com os descritos na literatura para o flavonol aromadendrina-4'-O-metil-éter (SILVA FILHO, 2006).

Todos os dados obtidos experimentalmente e os valores relatados na literatura estão apresentados na Tabela 15, o espectro de RMN de ^1H está apresentado no Apêndice.

Tabela 15. Dados dos espectros de RMN ^1H obtidos do composto BD-2 (aromadendrina-4'-*O*-metil-éter) e dados de RMN ^1H da literatura

Posições	^1H δ (ppm) [integral; multiplicidade; <i>J</i> (Hz)]	$^1\text{H}\delta$ (ppm) [integral; multiplicidade; <i>J</i> (Hz)]*
2	5,02 [1;d;11,6]	5,01[1;d;11,6]
3 ax	4,55 [1;d;11,6]	4,53 [1;d;11,6]
6	5,89 [1;d;2,1]	5,88[1;d;2,3]
8	5,93 [1;d;2,1]	5,93[1;d;2,3]
2'	7,45 [2;dd;8,8 e 2]	7,44 [2;dd;8,8 e 2]
3'	6,97 [2,dd;8,8 e2]	6,96[2;dd;8,8 e 2]
5'	6,97 [2,dd;8,8 e2]	6,96[2;dd;8,8 e 2]
6'	7,45 [2;dd;8,8 e 2]	7,44 [2;dd;8,8 e 2]
OCH ₃	3,82 [3;s]	3,81 [s]

* Dados obtidos para composto aromadendrina-4'-*O*-metil-éter (SILVA FILHO, 2006)

4.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO BD-3

O composto BD 3 (Figura 9) (4,1 mg) foi isolado da fração BD 48-53 (105 mg). A substância se apresentou como um pó amarelado amorfo, solúvel em MeOH deuterado, sendo esse o solvente de escolha para a realização das análises de RMN.

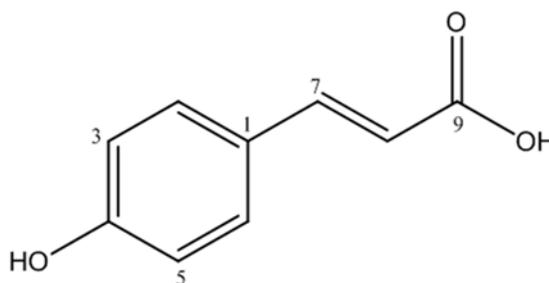


Figura 9. Estrutura química do composto BD-3.

Análise do espectro de RMN de ^1H evidenciou a ocorrência de dois dupletos, integrados para dois hidrogênios cada, em δ 7,45 [$J=8,6$] e δ 6,81 [$J=8,6$], indicando a presença de anel aromático dissubstituído.

Aos hidrogênios vinílicos H-7 e H-8, respectivamente, atribuíram-se os sinais de dois dupletos integrados para um hidrogênio cada em δ 6,28 [d, $J= 16$; 1H] e em δ 7,60 [d, $J= 16$; 1H]. Os dados obtidos experimentalmente condizem com os descritos na literatura para o fenilpropanoide ácido *p*-cumárico (SILVA FILHO, 2006).

Os dados obtidos experimentalmente e os valores de referência obtidos na literatura estão descritos na Tabela 16. Os espectros de RMN de ^1H estão apresentados no Apêndice.

Tabela 16. Dados dos espectros de RMN ^1H e obtidos do composto BD-3 (ácido *p*-cumárico) e dados de RMN ^1H da literatura.

Posições	$^1\text{H}\delta$ (ppm)	$^1\text{H} \delta$ (ppm)
	[integral; multiplicidade; <i>J</i> (Hz)]	[integral; multiplicidade; <i>J</i> (Hz)]*
2	7,45 [2;d,8,6]	7,44 [2;d;8,6]
3	6,81 [2;d,8,6]	6,79 [2;d; 8,6]
5	6,81 [2;d,8,6]	6,79 [2;d;8,6]
6	7,45 [2;d,8,6]	7,44 [2;d;8,6]
7	7,60 [1;d;16]	7,58[1;d;15,9]
8	6,28 [1;d;16]	6,28 [1;d;15,9]

* Dados obtidos para composto ácido *p*-cumárico (SILVA FILHO, 2006).

4.5 ISOLAMENTO EM CLAE-PREP DE COMPOSTOS DO EXTRATO DO LAVADO GLANDULAR DAS FOLHAS DE *B. dracunculifolia*

Após o fracionamento da fração BD-LHAc em coluna clássica e análise das frações reunidas por CCDC, as frações de 10 a 30 foram submetidas à análise por CLAE em modo analítico, o que possibilitou a escolha das frações que foram submetidas a CLAE-PREP na tentativa de isolamento dos componentes majoritários.

As frações que foram submetidas a CLAE-PREP e que possibilitaram o isolamento de substâncias foram:

- BD-LHAc 20 e 21- totalizando 45 mg que possibilitou o isolamento do composto BdL-1
- BD-LHAc 23 – 97,7 mg possibilitou o isolamento dos compostos BdL- 1 e BdL- 2
- BD-LHAc 25 – 87,9 mg possibilitou o isolamento de BdL- 2

As substâncias isoladas foram analisadas por experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , como descrito no item 3.19, o que possibilitou a determinação de suas estruturas químicas.

4.6 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA BdL-1

A substância BdL-1 (Figura 10) se apresentou como pó cristalino, branco, solúvel em metanol deuterado, sendo esse o solvente utilizado para as análises de RMN. A análise de espectro de RMN de ^1H dessa substância evidenciou a presença de dois duplos dupletos em δ 3,12 (1H, dd, $J= 17,1$ Hz; 12,9 Hz) e δ 2,72 (1; dd, $J= 17,1$ Hz; 3,0 Hz) atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-3 ax. e H-3 eq.

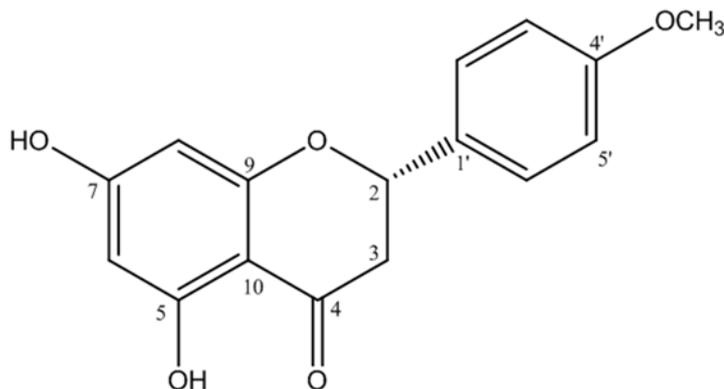


Figura 10. Estrutura química do composto BdL-1.

Pode-se observar também a presença de um duplodupletos em δ 5,39 [dd, $J=12,8$; 2,8], integrado para 1 hidrogênio, que foi atribuído ao hidrogênio H-2 do anel C, sugerindo assim se tratar de uma flavanona.

O espectro apresentou também dois dupletos em δ 7,42 e em δ 6,96, ambos integrados para dois hidrogênios cada com constante de acoplamento $J= 8,6$ Hz. Esses dados sugerem que estes sinais sejam referentes aos hidrogênios presentes no anel aromático B que se apresenta *para* dissubstituído. Os hidrogênios das posições 6 e 8 do anel A podem ser observados na forma de um duplo dupletos em δ 5,90 (H-6), integrados para dois hidrogênios cada com constantes de acoplamento $J= 8,5$ e 2,0 Hz. O sinal de simpleto em δ 3,81, integrado para três hidrogênios, indica a presença de um grupo metoxílico na molécula. A presença desse grupo pode ser confirmada no espectro de ^{13}C no qual se verifica a presença de um sinal em δ 55,7, característico de deslocamento químico de carbono ligado a grupo metoxílico, o qual foi atribuído ao carbono C- 4'.

A contagem total de sinais de carbonos no espectro de ^{13}C indica que a estrutura apresenta 16 carbonos o que é compatível com o esqueleto básico das flavanonas com metoxilação.

A análise dos dados de ressonância magnética nuclear obtidos nesse estudo e sua comparação com os dados da literatura (SILVA FILHO, 2006) nos permitem sugerir que a substância BdL-1 se trata da flavanona denominada isosakuranetina. Todos os dados obtidos com os experimentos de ^{13}C e ^1H , bem como os dados obtidos da literatura, estão descritos na Tabela 17. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão apresentados no Apêndice.

Tabela 17. Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , obtidos do composto BdL-1 (isosakuranetina) e dados de RMN ^1H e ^{13}C da literatura.

Posições	$\delta \text{ H (ppm)}$ [integral; multiplicidade; <i>J</i> (Hz)]	$\delta \text{ C}$ (ppm)	$\delta \text{ H (ppm)}$ [integral; multiplicidade; <i>J</i> (Hz)]*	$\delta \text{ C}$ (ppm)*
2	5,39 [1; dd, <i>J</i> = 12,8; 2,8]	80,3	5,35 [1; dd, <i>J</i> = 12,8; 3,0]	80,3
3ax	3,12 [1; dd, <i>J</i> = 17,1; 12,9]	44,0	3,08 [1; dd, <i>J</i> = 17,2; 12,8]	44,0
3eq	2,72 [1; dd, <i>J</i> = 17,1; 3,0]		2,65 [1; dd, <i>J</i> = 17,2; 3,0]	
4		197,6		197,6
5		164,8		164,8
6	5,90 [1; dd, <i>J</i> = 8,5; 2,0]	97,1	5,88 [1; d, <i>J</i> =2,0]	97,0
7		168,4		168,3
8	5,90 [1; dd, <i>J</i> =8,5; 2,0]	96,2	5,89 [1; d, <i>J</i> = 2,0]	96,2
9		165,5		165,5
10		103,3		103,4
1'		132,3		132,3
2'	7,42 [2; d; <i>J</i> = 8,6]	128,9	7,38 [2; dd, <i>J</i> =8,6; 2,0]	128,9
3'	6,96 [2; d; <i>J</i> = 8,6]	115,0	6,94 (2; dd, <i>J</i> =8,6; 2,0)	115,0
4'		161,4		161,4
5'	6,96 [2; d; <i>J</i> = 8,6]	115,0	6,94 [2; dd, <i>J</i> =8,6; 2,0]	115,0
6'	7,42 [2; d; <i>J</i> = 8,6]	128,9	7,38 [2; dd, <i>J</i> =8,6; 2,0]	128,9
OCH3	3,81 [3; s]	55,7	3,81 [3; s]	55,8

* Dados obtidos da literatura (SILVA FILHO, 2006).

4.7 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA BdL-2

A substância BdL-2 (Figura 11) se apresentou como pó amorfo de coloração amarelo intenso solúvel em metanol deuterado, sendo esse o solvente de escolha para as análises de RMN.

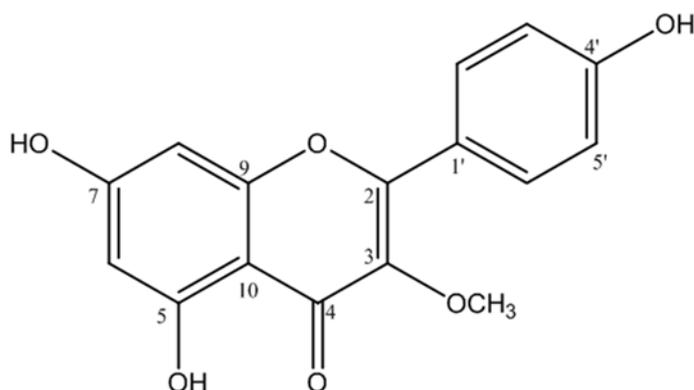


Figura 11. Estrutura química da substância BdL-2.

A análise do espectro de RMN de ^1H permitiu a visualização de dois dupletos em $\delta 6,41$ [1H, d, $J= 2,0$] e $\delta 6,19$ [1H, d, $J= 2,0$] atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H- 8 e H- 6 do anel A. Pode-se observar também a presença de um simpleto em $\delta 3,88$, integrado para três hidrogênios, que foi atribuído aos hidrogênios do grupo metoxílico na posição 3 do anel C, confirmado pela presença de um sinal de carbono em $\delta 56,3$ característico de deslocamento de carbono ligado a grupo metoxílico. A ausência de outros sinais de hidrogênio que se correlacionassem ao carbono 3 indicou que a estrutura em questão se trata de um flavonol.

Observa-se também a presença de outros dois dupletos integrados para dois hidrogênios cada, em $\delta 7,06$ [2, d, $J= 9,1$] atribuído ao hidrogênio H-3' e H- 5' e $\delta 8,19$ [2, d, $J=9,1$] que foram atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-6' do anel B, confirmando se tratar de um anel aromático para dissubstituído.

A análise do espectro de ^{13}C demonstra a presença de 16 carbonos na estrutura, o que é compatível com um esqueleto básico de flavonol com metoxilação.

A análise dos dados obtidos pelos experimentos de ^{13}C e ^1H para a substância BdL-2 e sua comparação com os dados da literatura nos permitem sugerir que a mesma se trata do flavonol 3-*O*-metil-kaempferol (GAO et al., 2012). Todos os dados obtidos com os

experimentos de ^{13}C e ^1H , bem como os dados obtidos da literatura, estão descritos na Tabela 18. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão apresentados no Apêndice.

Tabela 18. Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C obtidos do composto BdL-2 (3 - *O* - metil - kaempferol) e dados de RMN ^1H e ^{13}C da literatura.

Posições	$\delta \text{ H (ppm)}$ [integral; multiplicidade; J (Hz)]	$\delta \text{ C}$ (ppm)	$\delta \text{ H (ppm)}$ [integral; multiplicidade; J (Hz)]*	$\delta \text{ C}$ (ppm)*
2		158,7		155,6
3		148,0		137,6
4		177,9		177,9
5		166,1		166,1
6	6.19 [1, d, $J=2$]	99,7	6.19 [1, d, $J=2$]	98,5
7		169,8		164,1
8	6.41 [1, d, $J=2$]	94,9	6.42 [1, d, $J=2$]	93,7
9		162,9		156,3
10		105,0		104,2
1'		125,4		120,5
2'	8.19 [2, d, $J=9.1$]	131,0	7.92 [2, d, $J=7$]	130,1
3'	7.06 [2, d, $J=2$]	115,3	6.93 [2, d, $J=7$]	115,6
4'		163,0		160,1
5'	7.06 [2, d, $J=2$]	115,3	6.93 [2, d, $J=7$]	115,6
6'	8.19 [2, d, $J=9.1$]	131,0	7.92 [2, d, $J=7$]	130,1
OCH3	3.88 [3, s]	56,3	3.77 [3, s]	59,7

*Dados obtidos da literatura, solvente DMSO- d_6 (GAO et al.,2012)

4.8 SUBSTÂNCIAS OBTIDAS A PARTIR DO PROCESSO DE RECRISTALIZAÇÃO

A partir do processo de recristalização das frações BD-RH 3 e BD-RH 9, 10 e 11 foi possível obter duas substâncias, BdR-1 e BdR-2, respectivamente. As substâncias apresentaram alto grau de pureza e para determinação de suas estruturas químicas foram utilizadas análises de RMN de ^1H e ^{13}C , cujos resultados estão descritos a seguir.

4.9 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA BdR-1

A substância BdR-1 (Figura 12) se apresentou como cristais prismáticos incolores totalmente solúveis em clorofórmio deuterado, solvente utilizado para as análises de RMN. A análise do espectro de RMN de ^{13}C sugere que esta substância seja um triterpeno, pois evidencia a presença de 30 sinais de carbonos na molécula. Outra informação que pode ser verificada é a presença de dois carbonos olefínicos em δ 130,8 (C-22) e δ 125,2 (C-21) e de dois carbonos carbinólicos em δ 93,8 (C-10) e δ 84,3 (C-3).

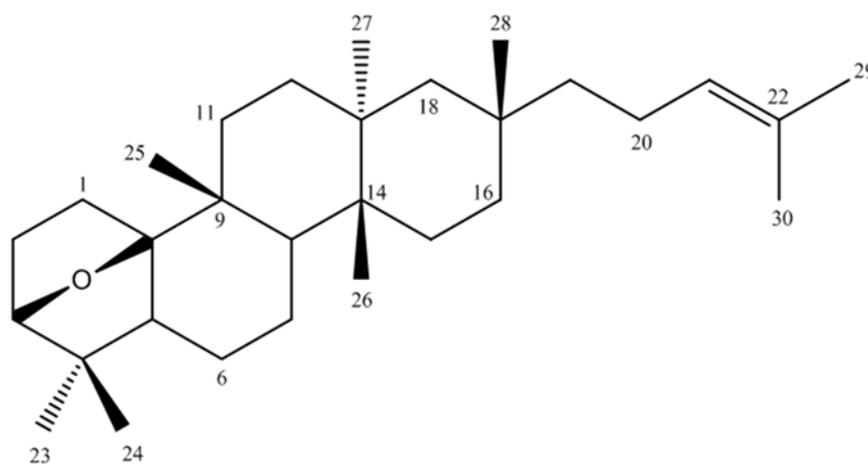


Figura 12. Estrutura química da substância BdR-1.

O espectro de RMN de ^1H apresenta sinais de hidrogênio carbinólico H-3 em δ 3,75 [1, d, $J=5,6$] e do hidrogênio H-21 em δ 5,10 [1, m]. Observa-se também a presença de oito simpletos, integrados para três hidrogênios cada, entre δ 1,68 e δ 0,89, o que sugere a existência de oito grupos metílicos. De acordo com referências da literatura, um dos principais triterpenos encontrados no gênero *Baccharis* é o óxido de baccharis (BOHLMANN et al, 1981).

Analisando-se os dados obtidos com os experimentos de RMN para a substância em questão e comparando-os aos dados obtidos com a literatura (SILVA FILHO, 2006) podemos sugerir que a substância trata-se do triterpeno óxido de baccharis. Todos os dados obtidos com os experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , bem como os dados obtidos da literatura e utilizados para comparação, podem ser observados na Tabela 19. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão apresentados no Apêndice.

Tabela 19. Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C obtidos do composto BdR-1(óxido de baccharis) e dados de RMN ^1H e ^{13}C da literatura.

Posições	$\delta\text{ C}$ (ppm)	$\delta\text{ H}$ (ppm) [integral; multiplicidade; J (Hz)]	$\delta\text{ C}$ (ppm)*	$\delta\text{ H}$ (ppm) [integral; multiplicidade; J (Hz)]*
1	32,1		32,0	
2	24,8		24,8	
3	84,3	3,75 [d, $J= 5,6$]	84,3	3,75 [d, $J=5,6$]
4	43,4		43,3	
5	53,2		53,1	
6	19,7		19,6	
7	20,2		20,1	
8	29,5		29,1	
9	37,4		37,3	
10	93,8		93,8	
11	29,8	2,24 [td, $J= 13,7$ e $4,9$]	29,8	2,23 [td, $J= 14,0$ e $5,3$]
12	32,3		32,3	
13	36,6		36,5	
14	39,2		39,1	
15	29,5		29,4	
16	34,6		34,6	
17	31,8		31,8	
18	44,2		44,2	
19	43,1		43,0	
20	22,9		23,0	
21	125,2	5,10 [m]	125,3	5,09 [t, $J= 7,0$]
22	130,8		130,8	
23	22,9	0,90 [s]	22,8	0,88 [s]
24	24,3	1,01 [s]	24,2	1,00 [s]
25	22,1	1,24 [s]	22,0	1,23 [s]
26	15,4	1,03 [s]	15,4	1,03 [s]
27	20,0	1,05 [s]	20,0	1,05 [s]
28	32,9	0,89 [s]	32,8	0,89 [s]
29	17,6	1,60 [s]	17,5	1,59 [s]
30	34,7	1,68 [s]	35,7	1,68 [s]

* Dados obtidos da literatura (SILVA FILHO, 2006)

4.10 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA BdR- 2

A substância BdR-2 (Figura 13) foi obtida sob a forma de cristais hexagonais transparentes, parcialmente solúveis em clorofórmio e piridina, assim uma mistura de clorofórmio deuterado e piridina deuterada foi utilizada na obtenção dos espectros de RMN.

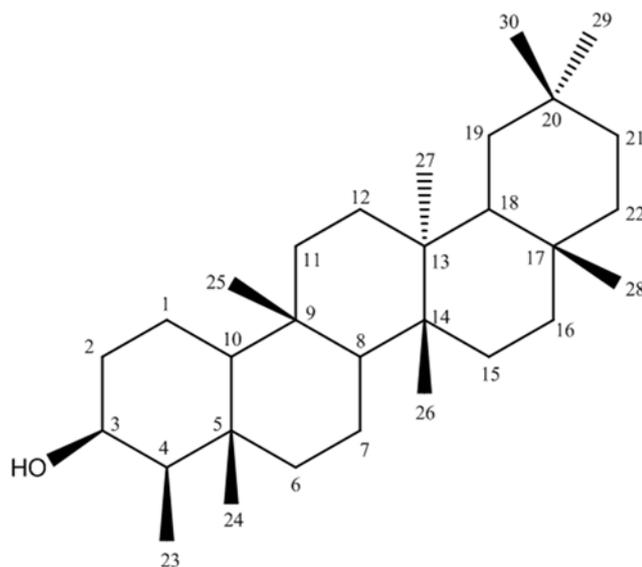


Figura 13. Estrutura química da substância BdR-2.

Analisando-se o espectro de ^{13}C e DEPT 135 observa-se a presença de 30 carbonos, o que indica que a substância se trata de um triterpeno, sendo 6 deles carbonos quaternários. Observa-se também um sinal de carbono em δ 72,04, característico de carbono carbinólico, o qual foi atribuído ao carbono 3.

A análise do espectro de ^1H indicou a presença de um simpleto, integrado para um hidrogênio em δ 3,48, o qual foi atribuído ao H-3. Observa-se também a presença de oito simpletos integrados para três hidrogênios cada entre δ 1,20 e δ 0,89, que foram atribuídos aos oito grupos metílicos dos carbonos 23 a 30. Observa-se também a presença de um tripleto em δ 1,75 integrado para 1 hidrogênio [1, t, $J=13$] que foi atribuído, através da análise de espectro de HMQC, ao hidrogênio do carbono 6, bem como a presença de um duplete em δ 2,01 integrado para 1 hidrogênio [1, d, $J=13$] que foi atribuído ao hidrogênio da posição 2.

A análise conjunta dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância BdR-2 e sua análise conjunta com os dados da literatura, possibilitaram indicar que a substância se trata do triterpeno friedelanol (SALAZAR et al 2000).

Todos os dados obtidos com os experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , bem como os dados obtidos da literatura e utilizados para comparação, estão descritos na Tabela 20. Os espectros de RMN de ^{13}C , ^1H , DEPT e HMQC estão apresentados no Apêndice.

Tabela 20. Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , obtidos do composto BdR-2 (friedelanol) e dados de ^1H e ^{13}C da literatura.

Posições	$\delta\text{ C}$ (ppm)	$\delta\text{ H}$ (ppm) [integral; multiplicidade; <i>J</i> (Hz)] HMQC	$\delta\text{ C}$ (ppm)*	$\delta\text{ H}$ (ppm) [integral; multiplicidade; <i>J</i> (Hz)]* HMQC
1	16,75		16,16	
2	36,68	2,01 [1, d, <i>J</i> = 13]	36,14	1,99 [1, qd, <i>J</i> =13 e 3]
3	72,04	3,83 [1,s]	71,59	3,81 [q-like 2]
4	50,02	1,28 [1,s]	49,62	1,25 [1]
5	38,66		38,09	
6	42,54	1,75 [1, t, <i>J</i> = 13]	41,99	1,76 [1, td, <i>J</i> = 12 e 3]
7	18,93		17,69	
8	53,81	1,30 [1, s]	53,27	1,28
9	37,72		37,18	
10	62,20	0,97 [1, s]	61,65	0,93 [1, dd, <i>J</i> =12, e 2]
11	36,20		35,66	
12	31,25		30,69	
13	38,92		38,38	
14	40,23		39,69	
15	32,88		32,34	
16	36,51		35,90	
17	30,57		30,02	
18	43,41		42,88	
19	35,91		35,36	
20	28,72		28,17	
21	33,42		32,88	
22	39,84		39,28	
23	12,71	1,03 [5, d <i>J</i> =9,5]	12,09	1,02 [7, d]
24	17,17	1,13 [s]	16,58	1,10 [s]
25	19,27	0,89 [s]	18,35	0,89 [s]
26	20,70	0,99 [s]	20,13	0,99 [s]
27	19,95	1,04 [s]	18,69	1,02 [s]
28	32,67	1,20 [s]	32,12	1,18 [s]
29	35,60	0,97 [s]	35,02	0,97 [s]
30	32,42	1,02 [s]	31,85	1,02 [s]

* Dados obtidos na literatura (SALAZAR et al., 2000).

4.11 DESCRIÇÃO DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE *P. elliotii*

A análise da fração volátil da resina de *P. elliotii* por CG/EM possibilitou identificar a presença de 12 constituintes na fração, todos compostos pertencentes a classe dos monoterpenos. Os constituintes que apresentaram-se como majoritários em percentagem de área foram o α -pineno (54 %) e o α -felandreno (35%). O monoterpeno α -pineno é o componente majoritário descrito para a grande maioria das frações voláteis obtidas da resina de espécies de *Pinus. sp*, e é utilizado como produto de partida para a síntese do α -terpineol, monoterpeno com alta atividade antimicrobiana e princípio ativo nas formulações que contém o óleo de pinho.

Diferente do esperado, o outro componente majoritário encontrado nas frações voláteis foi o α -felandreno, quando esperava-se que o β -pineno se apresentasse como o segundo componente majoritário. Comumente, a rota biosintética que leva a formação de α e β pinenos mantém proporções fixas na formação dos dois componentes, porém alguns fatores podem influenciar essa rota biosintética levando a formação de grande variedade de outros monoterpenos. Tais variações podem ocorrer devido a variações no substrato das reações ou por alterações conformacionais durante o processo de ciclagem do substrato geranyl difosfato, o que é possível devido a alterações estruturais das enzimas que participam do processo, normalmente relacionado a alterações de resíduos de aminoácidos (WAGSCHAL et al., 1991).

As substâncias identificadas, bem como seus índices de retenção de Kovats, obtidos para as análises e os índices encontrados na literatura, estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Constituintes químicos presentes na fração volátil da resina de *P. elliotii*.

Substância	Tempo de retenção	Área (%)	I. K. calculado	I. K. literatura
Triciclono	5.367	0.25	922	926
α -tujeno	5.420	0.14	924	927
α -pineno	5.648	54.15	932	933
canfeno	6.077	1.23	948	953
sabineno	6.695	1.01	970	972
β -pineno	6.864	5.00	977	978
mirreno	7.148	1.22	987	991
α -felandreno	7.731	0.94	1006	1007
α -terpineno	8.081	0.22	1016	1018
<i>p</i> -cimeno	8.346	0.31	1023	1025
α -felandreno	8.586	35.43	1030	1031
terpinoleno	10.575	0.11	1084	1086

I.K. - Índice de Kovats

4.12 ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE-UV-DAD E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS DE *P. elliotii* POR CLAE-PREP

Vários métodos foram utilizadas na tentativa de se isolarem os componentes majoritários do extrato de *P. elliotii*, porém sem sucesso.

Ao observarmos o cromatograma do extrato aventou-se a possibilidade do isolamento de seus componentes utilizando-se técnica de CLAE-PREP. Essa técnica foi empregada utilizando-se o método descrito no item 3.16. Esse procedimento possibilitou o isolamento de quatro componentes a partir do extrato de *P. elliotii*. Porém, somente duas das substâncias isoladas foram obtidas em quantidade suficiente para os processos de determinação estrutural e posterior utilização em testes antimicrobianos *in vitro*. O cromatograma do extrato e das substâncias isoladas está apresentado na Figura 14.

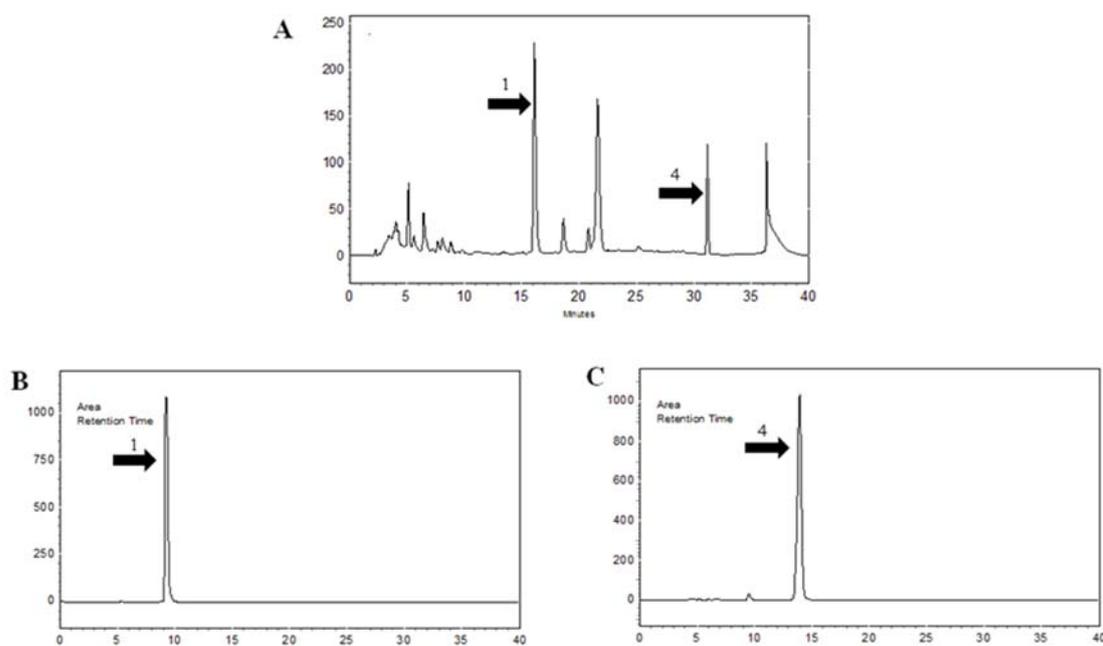


Figura 14. Perfis cromatográficos obtidos em CLAE-UV-DAD do extrato de *P. elliotii* (A) e das substâncias isoladas por CLAE-PREP (B) e (C). Os números 1 e 4 indicam os picos das substâncias que estavam presentes no extrato e seus perfis após o isolamento.

Mesmo empregando-se a mesma metodologia e condições experimentais de análise em CLAE-DAD-UV tanto para o extrato quanto para as substâncias isoladas, observou-se alteração no tempo de retenção das substâncias isoladas. Na tentativa de se verificar a pureza das substâncias isoladas, as mesmas foram analisadas por CG-MS, seguindo a metodologia descrita no item 3.17. As análises indicaram que as substâncias se tratavam de diterpenos. A substância denominada Pe-1 apresentou elevado grau de pureza e foi identificada por comparação de seu espectro de fragmentação de massas com o banco de dados como sendo o ácido deidroabiético. Já a substância denominada Pe-4 apresentou-se como mistura de diterpenos, sendo que o ácido caurenóico se apresentava como composto majoritário dessa mistura. Assim, somente a substância Pe-1 foi submetida a experimentos de RMN para comprovação de sua estrutura química. Os cromatogramas da CG e os espectros de fragmentação de massas podem ser observados na Figura 15.

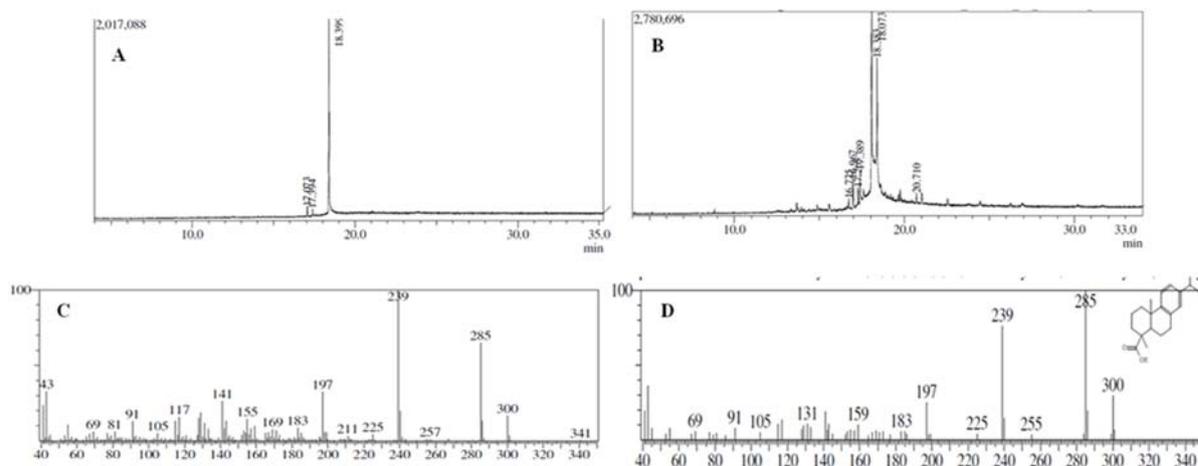


Figura 15. Perfil cromatográfico obtido por CG-EM para a substância isolada Pe- 1 (A) e perfil obtido para substância isolada Pe – 4 (B). Espectro de fragmentação da substância Pe-1 (C), espectro de fragmentação de massas da biblioteca (NIST08.LIB) para as substâncias ácido deidroabiético (D).

4.13 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA Pe- 1

A substância Pe-1 (Figura 16) apresentou-se como um pó branco, amorfo, solúvel em clorofórmio deuterado, o qual foi o solvente de escolha para a realização dos experimentos de RMN.

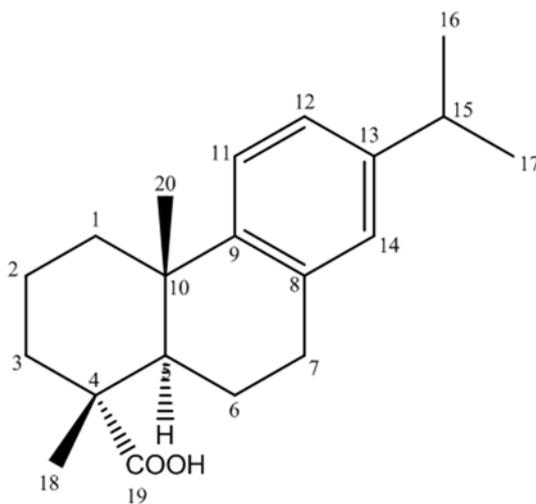


Figura 16. Estrutura química do composto Pe-1.

Analisando-se o espectro de ^{13}C observou-se a presença de 19 sinais, sendo um deles mais intenso em δ 24,0 indicando a presença de dois carbonos com o mesmo deslocamento

químico. Assim, o sinal foi atribuído aos carbonos C-16 e C-17, totalizando assim sinais para 20 carbonos, indicando que a estrutura se trata de um diterpeno.

Observou-se também a presença de um sinal de carbono em δ 184,5 indicando a presença de grupo carboxílico na molécula, sendo tal sinal atribuído ao carbono C-18. Três sinais de carbonos δ 126,9; δ 124,1; δ 123,9 são considerados sinais característicos de carbonos de anel aromático, indicando assim a presença do mesmo na estrutura. Esses sinais foram atribuídos, respectivamente, aos carbonos C-14, C- 11 e C -12. A análise do espectro de ^1H confirma a presença de um anel aromático, pois se pode observar sinais em δ 6,89 [1, d, $J= 1,4$], δ 7,17 [1, d, $J= 8,2$], δ 7,00 [1, dd, $J=8,1$ e $1,8$], integrados para um hidrogênio cada, os quais foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H- 14, H- 11 e H- 12.

Os dados obtidos com os experimentos de ^1H e ^{13}C e comparação com os dados da literatura (GONZÁLEZ et al., 2010) e a análise realizada por CG-MS nos permitiu indicar que a estrutura em questão se trata do diterpeno ácido deidroabiético. Todos os dados obtidos com os experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , bem como os dados obtidos da literatura e utilizados para comparação, podem ser observados na Tabela 22. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão apresentados no Apêndice.

Tabela 22. Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , obtidos do composto Pe-1 (ácido deidroabiético) e dados de ^1H e ^{13}C da literatura

Posições	$\delta\text{ C}$ (ppm)	$\delta\text{ H}$ (ppm) [integral; multiplicidade; J (Hz)]	$\delta\text{ C}$ (ppm)*	$\delta\text{ H}$ (ppm) [integral; multiplicidade; J (Hz)]*
1	37,9		37,9	
2	18,5		18,5	
3	36,9		36,8	
4	47,4			
5	44,6		44,6	
6	21,8		21,8	
7	30,0		30,0	
8	134,7		134,7	
9	146,7		146,7	
10	36,9		36,8	
11	124,1	7,17 [1, d, $J=8,2$]	124,1	7,16 [1, d, $J=8,4$]
12	123,9	7,00 [1, dd, $J=8,1$ e $1,8$]	123,8	6,99 [1, dd, $J=8,1$ e $1,5$]
13	145,7		145,7	
14	126,9	6,89 [1, d, $J=1,4$]	126,9	6,88 [1, br s]
15	33,5	2,82 [1, dt, $J=13,8$ e $6,9$]	33,4	2,85 [1, m]
16	24,0	1,21 [6, d, $J=1,7$]	24,0	1,21 [6, d, $J=6,9$]
17	24,0	1,21 [6, d, $J=1,7$]	24,0	1,21 [6, d, $J=6,9$]
18	184,7		184,5	
19	25,1	1,23 [3,s]	25,1	
20	16,2	1,28 [3,s]	16,2	1,28 [3,s]

* Dados obtidos na literatura (GONZALEZ. et al., 2010)

4.14 CONSIDERAÇÕES FITOQUÍMICAS

O fracionamento do extrato de *B. dracunculifolia* em HSCCC mostrou-se efetivo, pois possibilitou uma alteração significativa na complexidade das frações obtidas utilizando-se menor quantidade de solvente e com menor tempo de análise. Utilizando-se a CCC associada a CLAE-PREP foi possível o isolamento de três compostos.

O composto 1 foi identificado como um flavonoide, a flavona hispidulina já descrita em várias espécies do gênero *Baccharis*, porém descrita pela primeira vez na espécie em estudo. Dados da literatura conferem a essa substância atividades antioxidantes, anti-angiogênica e anticancerígena. (HE et al, 2010; VERDI et al, 2005; DABAGHI-BARBOSA et al, 2005; MOREIRA et al, 2003).

O composto 2, o flavonol aromadendrina 4'-*O*-metil- éter e o fenilpropanoide ácido *p*-cumárico foram descritos previamente como metabólitos secundários da espécie em estudo (MISSIMA et al., 2007; SILVA FILHO, 2006).

Utilizando-se outras técnicas cromatográficas foi possível o isolamento de duas outras substâncias, presentes no extrato do lavado de tricomas glandulares das folhas de *B. dracunculifolia*. As duas substâncias fazem parte da classe dos flavonoides, sendo a primeira delas a Isosakuranetina identificada previamente para a espécie em estudo e o flavonol 3 - *O* - metil - kaempferol, previamente identificado para espécies do gênero *Baccharis*, porém identificado pela primeira vez para a espécie *B. dracunculifolia* (GAO et al.,2012; SILVA FILHO, 2006).

A partir do extrato das raízes da espécie foi possível o isolamento de dois triterpenos já descritos para a espécie, o óxido de baccharis e o friedelanol.

A partir do extrato da resina de *P. elliotii* foi possível o isolamento do ácido deidroabiético, diterpeno ácido de ocorrência comum em resinas de espécies do gênero.

RESULTADOS PARTE I – ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

4.15 AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *B. dracunculifolia* PARA DETERMINAÇÃO DA CIM

Neste ensaio foram avaliados o extrato das folhas de *B. dracunculifolia* (extrato BD) e as frações obtidas do mesmo por partição líquido-líquido: fração hexânica (F. hexânica BD), fração em diclorometano (F. CH₂Cl₂ BD), fração em acetato de etila (F. AcOEt BD) e fração butanólica (F. *n*-BuOH BD), bem como os extratos do lavado de tricomas glandulares de *B. dracunculifolia* (BD-L) e o extrato hidroalcoólico das raízes de *B. dracunculifolia* (BD-R).

Dentre todos os extratos e frações testados pudemos observar que nenhum apresentou atividade frente a *E. coli*, *S. choleraesuis* e *P. aeruginosa* nas concentrações avaliadas. Já frente a *S. aureus*, o extrato BD (CIM 200 µg/ mL), a F. hexânica BD (CIM 400 µg/ mL), a F. CH₂Cl₂ BD (CIM 200 µg/ mL) e o extrato BD-L (CIM 200 µg/ mL) foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. Frente à bactéria *B. subtilis* pode-se observar inibição pela fração F. CH₂Cl₂ BD (CIM 400 µg/ mL) e o extrato BD-L (CIM 400 µg/ mL) e frente à bactéria *H. pylori* o extrato Bruto BD (CIM 400 µg/ mL) e as frações, F. hexânica BD (CIM 400 µg/ mL) e F. CH₂Cl₂ BD (CIM 400 µg/ mL), bem como o extrato BD-L (CIM 400 µg/ mL) foram capazes de inibir o crescimento bacteriano.

Todos os valores obtidos para a avaliação dos extratos e frações de *B. dracunculifolia* estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Ensaio *in vitro* para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos e frações de *B. dracunculifolia* (BD).

Extratos e frações de <i>B. dracunculifolia</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)		<i>E. coli</i> (ATCC 11229)		<i>S. choleraesuis</i> (ATCC10708)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15442)		<i>B. subtilis</i> (ATCC 19659)		<i>H. pylori</i> (ATCC43504)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	Extrato BD	200	400	-	-	-	-	-	-	-	-	400
F. hexânica BD	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	400	400
F. CH ₂ Cl ₂ BD	200	400	-	-	-	-	-	-	400	400	400	400
F. AcOEt BD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. <i>n</i> -BuOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BD-L	200	400	-	-	-	-	-	-	400	400	400	-
BD-R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antimicrobianos												
Penicilina	0,023	0,023							0,0461	0,0461		
Streptomomicina			4,609	4,609	9,22	18,44	9,22	9,22				
Clarithromicina											0,039	0,039

Valores de CIM e CFM em µg/mL

No presente estudo também foram avaliadas substâncias isoladas a partir dos extratos de *B. dracunculifolia*, bem como padrões obtidos comercialmente que já foram identificados na espécie. As substâncias avaliadas foram: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico; os fenilpropanoides prenilados bacarina, drupanina e artepelin C; os flavonoides isosakuranetina, aromadendrina-4'-*O*-metil éter, hispidulina e 3-*O* – metil kaempferol; os triterpenos óxido de baccharis e friedelanol.

Dentre as substâncias testadas não foi possível observar inibição frente às bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa*, nas concentrações utilizadas no ensaio. Somente a substância isosakuranetina apresentou-se ativa frente à bactéria *S. choleraesuis*, apresentando valor de CIM de 1,4 µM. Porém, não apresentou atividade bactericida nessa concentração.

Frente à *S. aureus* o ácido cafeico (CIM 2,22 µM), o ácido ferúlico (CIM 2,06 µM) e a bacarina (CIM 0,27µM) apresentaram atividade inibitória.

Analisando-se os resultados obtidos frente ao *B. subtilis* observa-se que as substâncias bacarina (CIM 0,27 µM), drupanina (CIM 0,22 µM) e artepelin C (0,33 µM) apresentaram atividades inibitórias e bactericidas. Os resultados obtidos demonstram que os extratos, frações e as substâncias isoladas de *B. dracunculifolia* possuem atividade antibacteriana principalmente frente a bactérias GRAM+. Estudos realizados por Feresin e colaboradores (2003), com plantas do gênero *Baccharis* reportam constituintes antimicrobianos ativos frente a MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina) e outras linhagens sensíveis à *B. grisebachii*, ressaltando que a atividade do extrato bruto da planta foi mais pronunciada do que a atividade dos metabólitos isolados. Silva Filho (2008) descreveu atividade semelhante do extrato de *B. dracunculifolia* frente linhagem de MRSA, porém quando avaliou a atividade da substância bacarina a mesma não foi ativa. Nuño e colaboradores (2012) também demonstraram a atividade da tintura obtida a partir de *B. incarum* frente a *S. aureus* resistente a meticilina em formulações para utilização tópica.

Frente ao micro-organismo *H. pylori* as substâncias bacarina (CIM 0,27 µM), artepelin C (0,66 µM), isosakuranetina (CIM 0,35 µM), aromadendrina (CIM 0,66 µM) e hispidulina (CIM 0,66 µM) foram ativas.

A partir de estudos realizados por Warren e Marshal (1983) foi possível o isolamento de uma bactéria patogênica na mucosa gástrica humana, permitindo em estudos posteriores relacionar a infecção por *H. pylori* ao desenvolvimento de gastrites e úlceras pépticas (MARSHAL & WARREN, 1984).

O extrato de *B. dracunculifolia* é popularmente utilizado para o tratamento de disfunções gastrointestinais (QUEIROGA et al., 1990) e estudos realizados por Lemos e colaboradores (2007) relataram a atividade gastroprotetora do extrato hidroalcoólico da mesma. Assim, os resultados referentes às atividades antimicrobianas apresentadas tanto pelos extratos e frações quanto pelas substâncias isoladas de *B. dracunculifolia* podem indicar uma dupla atividade sobre os efeitos observados pela população.

B. dracunculifolia é a principal fonte botânica da própolis verde e estudos realizados por Banskota e colaboradores (2001), verificaram a atividade antibacteriana de substâncias isoladas do mesmo, frente a *H. pylori*, demonstraram que alguns de seus constituintes possuem atividade frente ao micro-organismo. Todos os valores de CIM e CBM para as substâncias estão apresentados na Tabela 24. As estruturas químicas e pesos moleculares das substâncias isoladas e dos antimicrobianos padrões estão apresentados na Figura 17.

Tabela 24. Avaliação *in vitro* para determinação da atividade antibacteriana de substâncias isoladas e padrões de *B. dracunculifolia*.

Substâncias	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)		<i>E. coli</i> (ATCC 11229)		<i>S. choleraesuis</i> (ATCC10708)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15442)		<i>B. subtilis</i> (ATCC 19659)		<i>H. pylori</i> (ATCC43504)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Ácido cafeico	2,22	2,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido ferúlico	2,06	> 2,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido cumárico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Óxido de baccharis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Friedelanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacarina	0,27	0,27	-	-	-	-	-	-	0,27	0,27	0,27	0,27
Drupanina	-	-	-	-	-	-	-	-	0,22	0,22	-	-
Artepelin C	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33	0,33	0,66	0,66
Isosakuranetina	-	-	-	-	1,4	>1,4	-	-	-	-	0,35	0,35
Aromadendrina – 4'-O- metil éter	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,66	>1,32
Hispidulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,66	0,66
3-O-Metil-kaempferol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antimicrobianos												
Penicilina	6,9x10 ⁻⁵	6,9x10 ⁻⁵								1,4x10 ⁻⁴	1,4x10 ⁻⁴	
Estreptomicina			0,008	0,008	0,032	0,032	0,032	0,032				
Claritromicina											5,22x10 ⁻⁵	5,22x10 ⁻⁵

Valores de CIM e CBM em µM

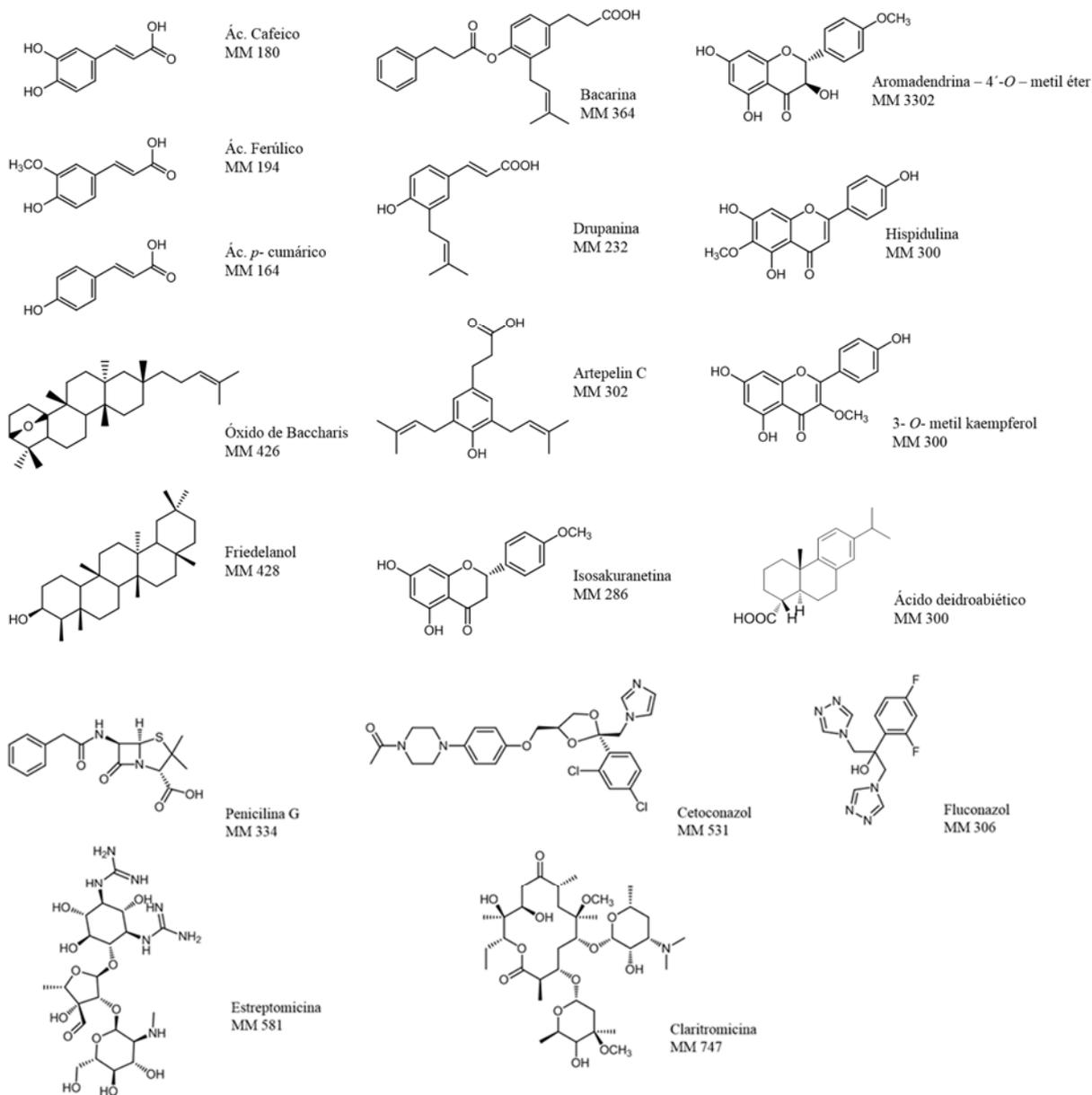


Figura 17. Estruturas químicas e massas moleculares das substâncias avaliadas para atividade antimicrobiana e dos antimicrobianos utilizados como padrão nos ensaios para determinação da CIM.

4.16 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE *B. dracunculifolia*, FRAÇÕES, SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E PADRÕES COMERCIAIS

Os extratos e frações de *B. dracunculifolia* também foram avaliados para atividade antifúngica frente ao fungo filamentosso *T. mentagrophytes* e ao fungo leveduriforme *C. albicans*.

Todos os extratos e frações testadas foram ativos frente ao fungo *T. mentagrophytes*, apresentando valores de CIM entre 200 µg/mL e 400 µg/mL, excetuando-se o extrato BD que foi ativo com valores de CIM de 100 µg/mL.

Analisando -se os resultados frente ao micro-organismo *C. albicans* verificamos que todos os extratos e frações obtidos a partir de *B. dracunculifolia* foram ativos com valores de CIM entre 200 µg/mL e 400 µg/mL. Todos os valores de CIM e CFM obtidos para avaliação da atividade antifúngica de extratos e frações de *B. dracunculifolia* estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de extratos e frações de *B. dracunculifolia*.

Extratos e frações de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	<i>T. mentagrophytes</i> (ATCC 9533)		<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	
	CIM	CFM	CIM	CFM
Extrato BD	100	200	400	400
F.hexânica BD	200	200	400	400
F. CH ₂ Cl ₂ BD	200	400	200	200
F. AcOEt BD	400	400	200	400
F. <i>n</i> -BuOH	200	>400	400	400
BD-L	400	>400	400	400
BD-R	400	>400	400	>400
Antimicrobianos				
Cetoconazol	0,78	3,125		
Fluconazol			512	512

Valores de CIM e CFM em µg/mL

As substâncias isoladas dos extratos de *B. dracunculifolia*, bem como os padrões adquiridos comercialmente, também foram avaliados para verificação da atividade antifúngica. Frente ao micro-organismo *T. mentagrophytes*, a única substância que não apresentou atividade foi a aromadendrina-4'-O-metil éter. O melhor resultado observado foi o valor de CIM de 0,17 μM para a substância isosakuranetina. Porém, a mesma só apresentou atividade fungistática nas concentrações avaliadas.

Frente à levedura *C. albicans* observou-se atividade inibitória pelas substâncias ácido cafeico (CIM 2,22 μM), ácido ferúlico (CIM 2,06 μM), ácido cumárico (CIM 1,22 μM), óxido de baccharis (CIM 0,47 μM), friedelanol (CIM 0,93 μM), bacarina (CIM 1,1 μM) e artepelin C (CIM 1,33 μM). Todos os resultados obtidos para o experimento com as substâncias estão descritos na Tabela 26. As estruturas químicas e os pesos moleculares das substâncias isoladas e dos antimicrobianos padrões estão apresentados na Figura 17.

Silva filho (2008) realizou estudo sobre a atividade de *B. dracunculifolia* e algumas substâncias isoladas da mesma frente *C. albicans*. Porém, nenhuma atividade foi observada. Isso pode ser explicado devido a diferenças de concentração das substâncias avaliadas e a diferença na linhagem utilizada para cada experimento. Estudos realizados por Pereira e colaboradores (2011) demonstraram atividade antifúngica do óleo essencial de *B. dracunculifolia* frente várias linhagens de *C. albicans* isoladas da cavidade oral de crianças em amamentação e de suas mães, com valores de CIM que variaram entre 0,4 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 26. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de substâncias isoladas e padrões obtidos de *B. dracunculifolia*.

Substâncias	<i>T. mentagrophytes</i> (ATCC 9533)		<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	
	CIM	CFM	CIM	CFM
Ácido cafeico	0,56	1,11	2,22	2,22
Ácido ferúlico	1,03	1,03	2,06	2,06
Ácido cumárico	1,22	2,44	1,22	1,22
Óxido de baccharis	0,94	0,94	0,47	0,94
Friedelanol	0,47	>0,94	0,93	0,93
Bacarina	0,55	0,55	1,1	1,1
Drupanina	0,86	>0,86	-	-
Artepin C	0,33	0,66	1,33	1,33
Isosakuranetina	0,17	>1,4	-	-
Aromadendrina – 4'-O-metil éter	-	-	-	-
Hispidulina	0,66	>1,33	-	-
3-O-Metil-kaempferol	1,33	>1,33	-	-
Antimicrobianos				
Cetoconazol	1,47x10 ⁻³ 5,89x10 ⁻³			
Fluconazol			1,67	1,67

Valores de CIM e CFM em μM

4.17 AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA DO EXTRATO DE *P. elliotii* E SUBSTÂNCIA ISOLADA, OBTIDO POR DETERMINAÇÃO DA CIM

O extrato de *P. elliotii*, bem como a substância isolada do mesmo, o diterpeno ácido deidroabiético, foram avaliados para determinação de atividade antibacteriana e antifúngica.

O extrato de *P. elliotii* apresentou-se ativo frente a todas as bactérias testadas, exceto *E. coli*, com valores de CIM considerados bons frente a *S. aureus* (CIM 100 µg/mL), *B. subtilis* (CIM 25 µg/mL) e *H. pylori* (CIM 100 µg/mL).

O extrato também foi ativo frente aos dois fungos avaliados. Porém, com melhores resultados frente ao fungo filamentosos *T. mentagrophytes* (CIM 50 µg/mL), quando comparado aos resultados obtidos para o fungo leveduriforme *C. albicans* (CIM 200 µg/mL).

O ácido deidroabiético não foi ativo frente às bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*. Porém, apresentou atividade frente a todos os outros micro-organismos avaliados: *S. aureus* (CIM 0,17 µM), *B. subtilis* (0,083 µM), *H. pylori* (CIM 0,083 µM), *T. mentagrophytes* (0,16 µM) e *C. albicans* (0,67 µM). Todos os resultados obtidos para o experimento estão descritos na Tabela 27. As estruturas químicas e pesos moleculares da substância isolada e dos antimicrobianos padrões estão apresentados na Figura 17.

Comparando-se os resultados obtidos para o extrato de *P. elliotii* com os obtidos para o ácido deidroabiético, pode-se inferir que o diterpeno seja em grande parte o responsável pela atividade observada para o extrato de *P. elliotii*. Relatos na literatura conferem aos diterpenos ácidos abiético, deidroabiético e neoabiético a responsabilidade pela atividade antibacteriana conferida para as resinas extraídas de espécies de *Pinus* (SÖDERBERG et al., 1990; SÖDERBERG et al., 1991).

Outros estudos relataram atividade antibacteriana e antifúngica, tanto de resinas de espécies de *Pinus* quanto do diterpeno ácido deidroabiético, bem como de substâncias derivadas do mesmo, a partir de modificações químicas de sua estrutura. Demonstraram ainda que as alterações estruturais incluindo um grupamento hidroxílico como substituinte no anel aromático da molécula do ácido deidroabiético propiciou uma melhora na atividade do mesmo frente ao fungo filamentosos *T. mentagrophytes*, bem como a presença da função aldeído na posição 4 ocasionou melhora na atividade frente *C. albicans*. (GIGANTE et al., 2002).

Estudos comprovam ainda a atividade do ácido deidroabiético e derivados obtidos a partir dele na inibição da secreção de ácidos estomacais, indicando ser um potencial agente antiulcerogênico. Aliado a isso demonstramos no presente estudo sua atividade antibacteriana frente a *H. pylori*, micro-organismo associado aos processos ulcerativos estomacais, indicando assim que essa substância tem potencial para ser utilizada no tratamento desse tipo de afecções (WADA et al., 1985; SEPÚLVEDA et al., 2005).

Tabela 27. Avaliação *in vitro* das atividades antibacteriana e antifúngica do extrato e substância isolada de *P. elliotii*, obtido para determinação da concentração inibitória mínima.

Extratos Substâncias	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)		<i>E. coli</i> (ATCC 11229)		<i>S. choleraesuis</i> (ATCC10708)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15442)		<i>B. subtilis</i> (ATCC 19659)		<i>H. pylori</i> (ATCC43504)		<i>T. mentagrophytes</i> (ATCC 9533)		<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CIM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>P. elliotii</i>	100	100	-	-	400	>400	400	>400	25	25	100	100	50	200	200	400
Ác. Deidroabiético	0,17	0,34	-	-	-	-	-	-	0,083	0,16	0,083	0,083	0,16	0,16	0,67	0,67
Antimicrobianos																
Penicilina (mg/mL)	0,023	0,023							0,0461	0,0461						
Penicilina (μ M)	$6,9 \times 10^{-5}$	$6,9 \times 10^{-5}$							$1,4 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-4}$						
Estreptomicina (μ g/mL)			4,609	4,609	9,22	18,44	9,22	9,22								
Estreptomicina (μ M)			0,008	0,008	0,016	0,032	0,016	0,016								
Cetoconazol (μ g/mL)													0,78	3,125		
Cetoconazol (μ M)													$1,47 \times 10^{-3}$	$5,9 \times 10^{-3}$		
Fluconazol (μ g/mL)															512	512
Fluconazol (μ M)															1,67	1,67
Claritromicina (μ g/mL)											0,039	0,039				
Claritromicina (μ M)											$5,2 \times 10^{-5}$	$5,2 \times 10^{-5}$				

Valores de CIM, CBM e CFM em μ g/mL para o extrato de *P. elliotii* e em μ M para a substância isolada; ácido deidroabiético

4.18 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *B. dracunculifolia* E DO EXTRATO DE *P. elliottii* A ANTIMICROBIANOS DE USO COMERCIAL

Para a avaliação dos efeitos de associação de extratos e frações aos antimicrobianos utilizados como controle positivo nas determinações de CIM descritas no presente estudo, selecionou-se somente os extratos que apresentaram alguma atividade frente aos micro-organismos analisados. Frente ao micro-organismo *S. aureus*, os extratos adicionados aos antimicrobianos foram: extrato BD (50 µg/mL), frações F. hexânica BD (100 µg/mL), F. CH₂Cl₂ BD (50 µg/mL), extrato BD-L (50 µg/mL), extrato PE (25 µg/mL). As concentrações apresentadas entre parênteses indicam a concentração de cada extrato que foi adicionado a cada poço da curva de diluição do antimicrobiano.

Analisando-se os resultados não se pode definir nenhuma interferência significativa nos valores de CIM obtidos para a penicilina associada quando comparada a penicilina não associada aos extratos ou frações, frente a *S. aureus*. Porém, pode-se observar uma alteração significativa nos valores de CBM quando se associou a penicilina aos extratos BD-R e ao extrato PE. A adição dos extratos propiciou um aumento no valor de CBM o que indica uma associação negativa entre a penicilina e esses extratos o que alterou sua capacidade bactericida frente à bactéria *S. aureus*.

As associações com estreptomicina foram realizadas somente com o extrato PE, pois esse foi o único extrato analisado que apresentou atividade inibitória tanto frente a *S. choleraesuis* quanto frente a *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos para essa associação demonstraram que o extrato PE (100 µg/mL) em nada alterou a capacidade inibitória e bactericida da estreptomicina frente aos dois micro-organismos avaliados.

Novas associações à penicilina foram realizadas para avaliar a influência sobre a mesma frente à bactéria *B. subtilis*. Para tanto, associaram-se ao antimicrobiano a fração F. CH₂Cl₂ BD (100 µg/mL), o extrato BD-L (100 µg/mL) e o extrato PE (6,25 µg/mL). Os resultados demonstram que mesmo o extrato PE tendo apresentado os menores valores de CIM, comparado aos outros extratos testados, ele não alterou de forma pronunciada nem a capacidade inibitória nem a capacidade bactericida da penicilina frente à bactéria *B. subtilis*, apesar de ter propiciado uma redução no valor de CIM de 0,046 µg/mL para 0,023 µg/mL. Dentre as associações a que apresentou melhor resultado foi a realizada com a fração F. CH₂Cl₂ que reduziu o valor de CIM de 0,046 µg/mL, que foi o apresentado pela penicilina sem associações,

para um valor de CIM de 0,012 µg/mL quando associada à fração, e a mesma redução pode ser observada para os valores de CBM.

Estudo semelhante foi realizado utilizando-se frações polares e apolares do extrato das folhas de *Baccharis caridifolia*. Resultados positivos também foram observados, inclusive demonstrando que as associações das frações com antimicrobianos foram positivas não só frente a bactérias Gram positivas como também frente a bactéria Gram negativa *E. coli* (ONOFRE et al., 2013).

Para avaliar os efeitos das associações com claritromicina frente a *H. pylori* foram realizadas associações com o extrato BD (100 µg/mL), as frações F. hexânica BD (100 µg/mL), F. CH₂Cl₂ BD (100 µg/mL) e o extrato PE (25 µg/mL). Todas as associações propiciaram uma redução dos valores de CIM e CBM, para claritromicina, frente a *H. pylori*. As concentrações de cada extrato e frações que foram associados aos antimicrobianos frente a cada bactéria avaliada estão apresentadas na Tabela 28 e os resultados de CIM obtidos a partir das associações podem ser consultados na Tabela 29.

Tabela 28. Concentrações dos extratos e frações de *B. dracunculifolia* e do extrato de *P. elliottii* que foram associadas aos antimicrobianos para avaliação da interação entre os mesmos.

Extratos e frações associados aos antimicrobianos	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	<i>S. choleraesuis</i> (ATCC10708)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15442)	<i>B. subtilis</i> (ATCC 19659)	<i>H. pylori</i> (ATCC43504)
	Concentração *				
Extrato BD	50	-	-	-	100
F.hexânica BD	100	-	-	-	100
F. CH ₂ Cl ₂ BD	50	-	-	100	100
F. AcOEt BD	-	-	-	-	-
F. <i>n</i> -BuOH	-	-	-	-	-
BD-L	50	-	-	100	-
BD-R	-	-	-	-	-
Extrato PE	25	100	100	6,25	25
Antimicrobianos					
Penicilina	4,7x10 ⁻⁴ – 5,9		4,7x10 ⁻⁴ – 5,9		
Estreptomicina	2,25x10 ⁻³ - 295		2,25x10 ⁻³ - 295		
Claritromicina	1,6x10 ⁻⁴ - 5				

* Na tabela estão apresentadas as concentrações (µg/mL) sub-inibitórias (1/4 valores de CIM) dos extratos e frações que foram adicionados ao antimicrobiano padrão, frente a cada micro-organismo avaliado. Nas linhas referentes ao antimicrobiano padrão estão apresentados os valores mínimo e máximo (µg/mL) de concentração obtidos a partir da diluição seriada.

Tabela 29. Avaliação da interação entre antibacterianos de uso comercial, extratos e frações de *B. dracunculifolia* e extrato de *P. elliottii* pela determinação da CIM com e sem associações.

Extratos e frações associados aos antimicrobianos	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)		<i>S. choleraesuis</i> (ATCC10708)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15442)		<i>B. subtilis</i> (ATCC 19659)		<i>H. pylori</i> (ATCC43504)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Extrato BD + anti*	0,046	0,046	-	-	-	-	-	-	0,020	0,020
F. hexânica BD + anti*	0,092	0,092	-	-	-	-	-	-	0,020	0,020
F. CH ₂ Cl ₂ BD + anti*	0,092	0,092	-	-	-	-	0,012	0,012	0,020	0,020
F. AcOEt BD + anti*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. <i>n</i> -BuOH + anti*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BD-L + anti*	0,092	2,95	-	-	-	-	0,092	0,092	0,020	0,020
BD-R + anti*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato PE+ anti*	0,046	2,95	9,22	9,22	18,44	18,44	0,023	0,023	0,020	0,020
Antimicrobianos										
Penicilina	0,046	0,046					0,046	0,046		
Streptomicina			9,22	9,22	18,44	18,44				
Clarithromicina									0,039	0,039

Valores de CIM e CBM em µg/mL.

* O antibiótico associado a cada extrato e fração depende do micro-organismo frente ao qual a mistura foi avaliada. Ao final da coluna de cada micro-organismo está descrito o valor de CIM e CBM obtido para o antimicrobiano padrão sem a adição de extrato ou fração.

Realizou-se também associações aos antifúngicos cetoconazol frente ao fungo filamentoso *T. mentagrophytes* e fluconazol frente ao fungo leveduriforme *C. albicans*. Ao antifúngico cetoconazol foram associados o extrato BD (25 µg/mL), as frações F. hexânica BD (50 µg/mL), F. CH₂CL₂ BD (50 µg/mL), F. AcOEt BD (100 µg/mL), F. *n*-BuOH BD (50 µg/mL), os extratos e BD-L (100 µg/mL) BD-R (100 µg/mL) e o extrato PE (12,5 µg/mL). Comparando-se os valores de CIM obtidos para o cetoconazol não associado com os valores para o cetoconazol associado pode-se observar que o extrato BD-L e as frações F. hexânica BD, F. CH₂CL₂ BD e F. AcOEt BD quando associadas ao cetoconazol levaram a elevação dos valores de CIM e CFM, denotando-se assim uma associação negativa entre o antifúngico e as frações e extrato. O extrato PE, dentre os extratos e frações analisados se mostrou o mais ativo frente a *T. mentagrophytes* e quando associado ao antifúngico propiciou uma redução de valores de CIM e CBM para o mesmo.

Associou-se o antifúngico fluconazol ao extrato BD (100 µg/mL), as frações F. hexânica BD (100 µg/mL), F. CH₂CL₂ BD (50 µg/mL), F. AcOEt BD (50 µg/mL), F. *n*-BuOH BD (100 µg/mL), os extratos BD-L (100 µg/mL) e BD-R (100 µg/mL) e o extrato PE (50 µg/mL). Quando se comparam os resultados de CIM obtidos para o fluconazol sem associação e o fluconazol associado é possível verificar que todos os extratos e frações testadas propiciaram reduções pronunciadas nos valores de CIM e alguns deles até nos valores de CFM.

O fluconazol sem associações apresenta valores de CIM e CFM de 512 µg/mL, quando associado aos extratos BD, BD-R e PE e às frações F. CH₂Cl₂ BD e F. *n*-BuOH BD os valores de CIM foram reduzidos para 4 µg/mL, ocasionando um aumento de 128 vezes na capacidade inibitória do antifúngico. O melhor resultado obtido foi com a associação entre fluconazol e a fração F. AcOEt BD que propiciou a redução dos valores de CIM para o valor de 2,0 µg/mL, num aumento de 256 vezes na capacidade inibitória do antifúngico. O valor de CBM também apresentou redução passando de 512 µg/mL para 64 µg/mL. As concentrações de cada extrato e frações que foram associados aos antifúngicos frente a cada fungo avaliado estão apresentadas na Tabela 30 e todos os valores de CIM obtidos no experimento estão apresentados na Tabela 31.

Tabela 30. Concentrações dos extratos e frações de *B. dracunculifolia* e do extrato de *P. elliottii* que foram associadas aos antimicrobianos para avaliação da interação entre os mesmos.

Extratos e frações associadas aos antifúngicos	<i>T. mentagrophytes</i> (ATCC 9533)	<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)
	Concentrações*	
Extrato BD	25	100
F.hexânica BD	50	100
F. CH ₂ Cl ₂ BD	50	50
F. AcOEt BD	100	50
F. <i>n</i> -BuOH	50	100
BD-L	100	100
BD-R	100	100
Extrato PE	12,5	50
Antimicrobianos		
Cetoconazol	8x10 ⁻³ - 100	
Fluconazol	0,25-512	

*Na tabela estão apresentadas as concentrações (µg/mL) sub-inibitórias (1/4 valores de CIM) dos extratos e frações que foram adicionados ao antimicrobiano padrão, frente a cada micro-organismo avaliado. Nas linhas referentes ao antimicrobiano padrão estão apresentados os valores mínimo e máximo (□g/mL) de concentração obtidos a partir da diluição seriada.

Tabela 31. Avaliação da interação entre antifúngicos de uso comercial, extratos e frações de *B. dracunculifolia* e extrato de *P. elliottii*, pela determinação da CIM com e sem associações.

Extratos e frações associadas aos antifúngicos	<i>T. mentagrophytes</i> (ATCC 9533)		<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	
	CIM	CFM	CIM	CFM
Extrato BD +anti*	0,78	25,0	4,0	16
F. hexânica BD + anti*	6,25	12,5	8,0	512
F. CH ₂ Cl ₂ BD + anti*	1,56	12,5	4,0	512
F. AcOEt BD + anti*	3,125	25,0	2,0	64
F. <i>n</i> -BuOH + anti*	0,78	6,25	4,0	512
BD-L + anti*	3,125	25,0	8,0	256
BD-R + anti*	0,78	6,25	4,0	256
Extrato PE + anti*	0,39	3,125	4,0	256
Antimicrobianos				
Cetoconazol	0,78	6,25		
Fluconazol			512	512

Valores de CIM e CFM em µg/mL.

* O antifúngico associado a cada extrato e fração depende do micro-organismo frente ao qual a mistura foi avaliada. Ao final da coluna de cada micro-organismo está descrito o valor de CIM obtido para o antimicrobiano padrão sem a adição de extrato e fração.

Existe grande relevância em se estudar interações entre extrato de plantas medicinais e medicamentos de uso clínico, tanto na verificação de efeitos positivos, o que possibilita uma nova abordagem na prática clínica (BUSH et al., 2011), quanto na prevenção de interações indesejadas que podem ocorrer pelo uso inadequado das plantas medicinais pela população (PITTLER, 2002).

Estudos fitoquímicos em busca de princípios bioativos apresentam-se como uma promessa de novos adjuvantes no tratamento de infecções. Levantamento realizado por Hemaiswarya et al. (2008) descreveu com detalhes o efeito sinérgico da associação de metabólitos secundários vegetais, entre si e com fármacos sintéticos, no combate a infecções

bacterianas, fúngicas e por micobactérias, demonstrando inclusive que o mecanismo de ação da combinação difere significativamente do que se observa quando se utiliza os mesmos princípios individualmente.

Na literatura encontramos vários estudos sobre a associação de óleos essenciais no tratamento de infecções. Podemos citar o levantamento realizado por Langeveld (2014) que relata o sinergismo entre componentes de óleos essenciais de várias espécies de plantas com antibióticos disponíveis no mercado. Bons resultados também foram encontrados no estudo realizado por Zago e colaboradores (2009) que investigaram as possíveis interações entre óleos essenciais de várias plantas utilizadas na culinária brasileira, combinados a oito fármacos antimicrobianos frente a doze linhagens de *S. aureus* e doze de *E. coli* isoladas de humanos.

Analisando-se todos os resultados de associação de extratos e frações com antimicrobianos, aqui apresentados, é possível verificar que nem sempre as associações se apresentam benéficas, mesmo quando os extratos se apresentam ativos frente aos microorganismos. Isso pode ocorrer por interações químicas ou físicas que levam a perda da capacidade de ação tanto do antimicrobiano quanto das substâncias presentes no extrato. Já em alguns casos mesmo quando extratos e frações não se apresentaram tão ativos quando utilizados isoladamente, quando associados a antimicrobianos comerciais podem potencializar o efeito do mesmo, sendo assim uma ferramenta na busca de novas abordagens frente o alto índice de resistência a antimicrobianos que vem sendo relatada.

Os antifúngicos utilizados como antimicrobianos padrões para esse estudo, fluconazol e cetoconazol atuam na célula fúngica desestruturando sua membrana. O mecanismo de ação dos mesmos consiste na inibição da esterol 14- α -desmetilase, um sistema de enzimas dependente do citocromo P450, comprometendo assim a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática ocasionando um acúmulo de 14- α -metilesteróis. O acúmulo dessas substâncias leva a um desarranjo estrutural das cadeias acíclicas de fosfolipídios o que compromete a função de sistemas enzimáticos relacionados as funções de membrana, como as ATPases e sistemas de transporte de elétrons o que ocasiona a inibição do crescimento fúngico. Alguns representantes das classes dos azóis possuem ainda a capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana fúngica quando utilizados topicamente (GOODMAN & GILMAN, 2005).

Estudo realizado por Johann e colaboradores (2012) demonstraram a atividade da fração hexânica do extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* e de substâncias isoladas da mesma, frente a quatro linhagens isoladas *Paracoccidioides brasiliensis*. Os compostos avaliados foram

o ácido ursólico, metil linolenato, óxido de cariofileno e trans nerolidol. A fração e três das quatro substâncias avaliadas apresentaram-se ativas frente às quatro linhagens de micro-organismos. Avaliou-se também a interferência da adição de concentrações subinibitórias tanto da fração hexânica quanto das três substâncias que se apresentaram ativas frente às linhagens fúngicas na morfologia celular do micro-organismo. Observou-se que todos alteraram o tamanho da membrana celular e levaram ao desenvolvimento de superfícies celulares irregulares, indicando que as substâncias interagem com ergosterol da membrana celular fúngica, afetando assim o crescimento do micro-organismo (JOHANN et al., 2012).

Baseando-se nos resultados obtidos no presente estudo e avaliando-se o mecanismo de ação dos antimicrobianos utilizados como padrões, bem como os resultados já observados por Johann e colaboradores (2012), sugere-se que os extratos de *B. dracunculifolia* e as frações obtidas do mesmo estejam agindo alterando a estrutura da membrana celular fúngica, da mesma forma que os antimicrobianos ao qual foram associados. Porém, foram observadas diferenças nas interações dos extratos e frações com fluconazol, o qual teve sua atividade potencializada e o cetoconazol o qual teve sua atividade inibida. Isso pode ter ocorrido devido a diferenças nos tempos de interação entre os antimicrobianos e os extratos e frações avaliados. *C. albicans* é um fungo leveduriforme de crescimentos rápido, para o qual observou-se a interação antifúngico e extratos por um período máximo de 24 horas. Já para *T. mentagrophytes*, um fungo filamentosos de crescimento lento, observou-se a interação dos extratos e frações por um período prolongado de cinco dias. Devido ao período maior de interação entre os mesmos, os extratos e frações possivelmente começaram a competir de alguma maneira com o antimicrobiano, podendo estar agindo como um antagonista competitivo, mais um forte indício de que os extratos e frações possuem substâncias que atuam em sítios ativos compartilhados aos antimicrobianos comerciais.

Já para o extrato da resina de *P. elliottii* não se observou tais variações, sendo que o mesmo potencializou a ação dos dois antifúngicos avaliados, frente aos dois micro-organismos, indicando que as substâncias presentes nesse extrato podem estar atuando por outro mecanismo.

Neste estudo observaram-se bons resultados de sinergismo em relação aos efeitos antimicrobianos e até o presente momento nunca havia se avaliado a interação dos extratos e frações de *B. dracunculifolia*, bem como o extrato da resina de *P. elliottii* com antimicrobianos de uso comercial. Os resultados demonstram que estudos mais aprofundados, verificando-se a possibilidade de se associarem os extratos de *B. dracunculifolia* e *P. elliottii* a formulações

contendo fluconazol, bem como estudos para verificar a eficácia *in vivo*, podem trazer benefícios a população, com uma nova abordagem no combate às linhagens resistentes. Estudos utilizando substâncias isoladas a partir desses extratos, principalmente em associação ao fluconazol, podem também se tornar base para o desenvolvimento de um produto com ação fungicida.

4.19 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DOS EXTRATOS DE *B. dracunculifolia* E *P. elliottii*.

Os extratos de *B. dracunculifolia* e *P. elliottii* foram testados para avaliação da atividade micobactericida utilizando-se a determinação da CIM, pela metodologia de microdiluição em microplaca, realizado de acordo com o método REMA segundo Palomino et al. (2002). Observou-se que tanto o extrato de *B. dracunculifolia* quanto o extrato da resina de *P. elliottii* apresentaram-se ativos frente às cinco espécies de micobactérias testadas, sendo o extrato de *P. elliottii* mais ativo frente todas as espécies. Os valores de CIM para os extratos frente às cinco espécies de micobacterias estão apresentados na Tabela 32.

Tabela 32. Ensaio *in vitro* para determinação da CIM dos extratos de *B. dracunculifolia* e *P. elliottii* frente à micobactérias.

Micro-organismo	<i>B. dracunculifolia</i> – µg/mL	<i>P. elliottii</i> – µg/mL	Isoniazida – µg/mL
<i>M. avium</i>	500	250	>1,0
<i>M. kansasii</i>	125	62,5	1,0
<i>M. tuberculosis</i>	500	62,5	0,06
<i>M. smegmatis</i>	>2000	1000	>1,0
<i>M. bovis</i>	125	62,5	0,3

Ramos e colaboradores (2008) avaliaram extratos de 36 espécies nativas da mata atlântica que foram testadas para atividade micobactericida frente a *M. tuberculosis* e a *M. kansasii*, sendo que somente cinco espécies apresentaram atividade frente a *M. tuberculosis*. Observa-se, assim, a relevância dos resultados obtidos nesse estudo, visto que os extratos das duas espécies em estudo foram ativos frente às linhagens patogênicas de micobactérias.

Kanlayavattanakul e colaboradores (2003) descreveram atividade frente a *M. tuberculosis* por cumarinas e de um flavonóide isolados de uma espécie da família Asteraceae.

4.20 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESINFETANTE BACTERICIDA

A avaliação da atividade desinfetante bactericida foi realizada frente à solução hidroalcoólica contendo 0,2 % de extrato de *Baccharis dracunculifolia* em álcool 40 °GL.

Para a realização dos ensaios utilizou-se para cada micro-organismo 10 cilindros carreadores para a realização do teste frente à solução avaliada, dois cilindros carreadores para teste frente à solução hidroalcoólica 40°GL, um cilindro carreador contaminado para teste de viabilidade do meio de subcultura e dois cilindros esterilizados para verificação da esterilidade dos cilindros.

Para que a solução avaliada seja considerada desinfetante bactericida ela deve eliminar a contaminação sobre todos os cilindros utilizados no teste. A solução hidroalcoólica contendo 0,2 % de extrato de *Baccharis dracunculifolia* em álcool 40 °GL foi capaz de eliminar a contaminação sobre todos os cilindros carreadores e frente a todos os micro-organismos tentados no tempo de exposição preconizado que é de 10 minutos (Figura 18).

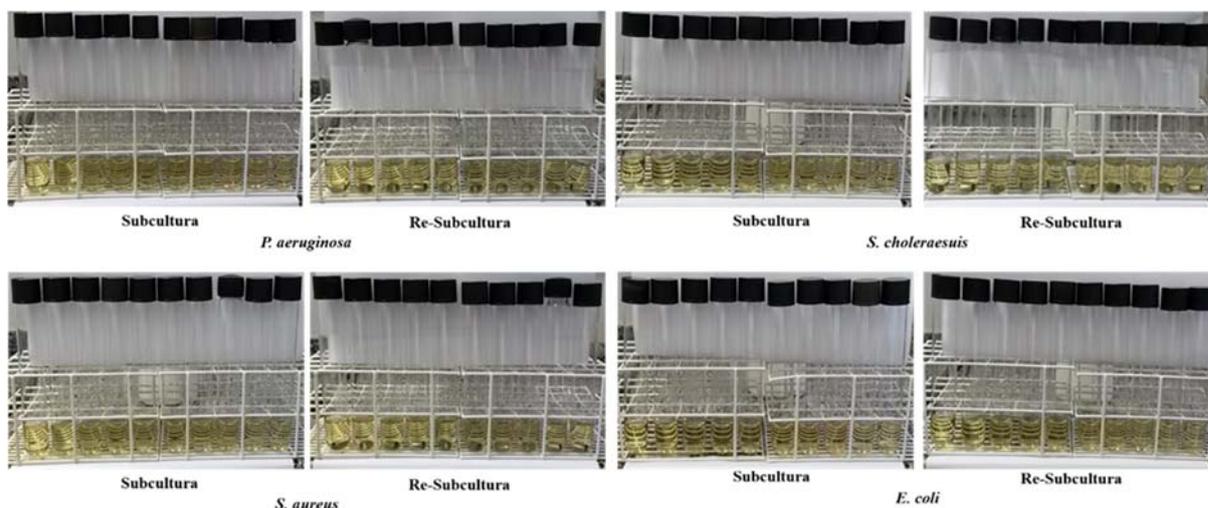


Figura 18. Avaliação da atividade desinfetante bactericida da solução hidroalcoólica contendo 0,2% de extrato de *B. dracunculifolia* em álcool 40°GL, frente aos micro-organismos *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*, *S. aureus* e *E. coli*, após 10 minutos de exposição dos cilindros à solução.

Quando se avaliou a atividade antimicrobiana do extrato de *B. dracunculifolia* observou-se que a mesma ocorre de forma mais pronunciada quando associada ao álcool 40°GL. A solução hidroalcoólica 40°GL foi avaliada sem a adição de extrato, a qual não foi capaz de eliminar a contaminação sobre os cilindros carreadores, comprovando assim que o extrato de *B. dracunculifolia*, quando associado ao álcool 40 °GL, é o responsável pela atividade desinfetante e essa associação é essencial para que se observe a atividade (Figura 19).

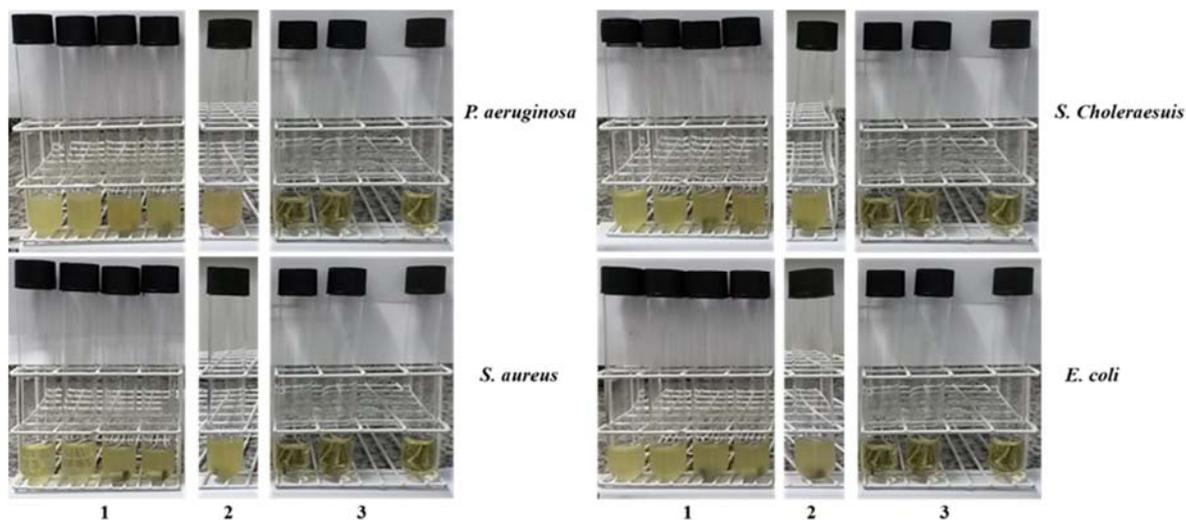


Figura 19. Resultados dos controles para o experimento da determinação da atividade desinfetante bactericida. (1) subcultura e re-subcultura dos micro-organismos expostos somente ao álcool 40 °GL, após 10 minutos de exposição dos cilindros à solução, (2) controle de viabilidade do meio de subcultura (3) controle de esterilidade de cilindros carreadores e meio de subcultura.

Como controles para validar o ensaio, foi realizada a contagem do número de UFC/mL presente nos cilindros carreadores, visando determinar a densidade microbiana para as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Foram obtidas densidades de 7,213 para *S. aureus* e 7,465 para *P. aeruginosa*, valores superiores a 6 que é a densidade mínima requerida. O controle de viabilidade do meio de subcultura foi positivo e os controles de esterilidade do meio de subcultura e esterilidade de cilindros carreadores não apresentaram crescimento microbiano, os quais validam o experimento.

Achados semelhantes foram descritos por Avancini e colaboradores (2000), estudo no qual foi descrita a atividade desinfetante de outra espécie do gênero *Baccharis*. O decocto das partes aéreas da espécie *Baccharis trimera* foi avaliado frente bactérias causadores de processos infecciosos no manejo de animais e foi ativo frente as mesmas, demonstrando o potencial de utilização da espécie como agente desinfetante.

Os álcoois são muito utilizados como agentes antimicrobianos e, em muitos casos, como adjuvantes em formulações antissépticas. Em baixas concentrações podem ser utilizados como conservantes e potencializadores da ação de outros agentes biocidas. O etanol é o mais utilizado no Brasil, porém outros álcoois como o isopropanol e o *n*- propanol também podem ser utilizados para esse fim. A atividade antimicrobiana dos álcoois é significativamente baixa em concentrações abaixo de 50%, não sendo considerado agente antimicrobiano nessas concentrações, considerando-se as concentrações entre 60 e 90% as ideais para que se observe a ação antimicrobiana. Os álcoois atuam na membrana celular dos micro-organismos promovendo a dissolução de fosfolípides de membrana ocasionando perda da organização estrutural, afetando assim a integridade da membrana o que acarreta na liberação progressiva e descontrolada de material intracelular, desencadeando um processo de ruptura celular (FRAISE, 1999; DENYER & STEWART, 1998).

Bactérias Gram positivas são mais resistentes à ação dos álcoois do que as bactérias Gram negativas. Essa resistência se deve às características da membrana plasmática dos micro-organismos Gram positivos, que possuem uma parede celular mais espessa, o que acaba por limitar a ação desses agentes. Mesmo com essa limitação os álcoois são considerados agentes de amplo espectro, apresentando-se ativos frente a bactérias vegetativas, vírus e fungos. Apesar de não serem considerados agentes esporocidas, apresentam efeito inibitório sobre a esporulação e germinação de esporos (PENNA et al., 2001).

Considerando todos esses fatores, e avaliando as atividades apresentadas no presente estudo, podemos atribuir ao extrato de *B. dracunculifolia* a ação desinfetante observada, visto que o álcool na concentração utilizada, 40°GL, o que representa aproximadamente 42%, não é considerado um agente antimicrobiano efetivo, mas sim um potencializador para a ação de substâncias biocidas.

4.21 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESINFETANTE FUNGICIDA

A avaliação da atividade fungicida foi realizada para as seguintes soluções:

- Solução hidroalcoólica contendo 0,2 % de extrato de *B. dracunculifolia* em álcool 40 °GL
- Solução hidroalcoólica contendo 0,2% de extrato de *P. elliottii* em álcool 40°GL.

Para que a solução seja considerada desinfetante fungicida ela deve ser capaz de eliminar os conídios presentes na suspensão teste a partir de 10 minutos de exposição dos mesmos à solução. Os ensaios demonstraram que as soluções de *B. dracunculifolia* 0,2% em álcool 40 °GL e a solução de *P. elliottii* 0,2% em álcool 40°GL apresentam atividade desinfetante fungicida, sendo capazes de eliminar os conídios presentes na solução teste mesmo com o menor tempo de exposição que é de cinco minutos (Figura 20).

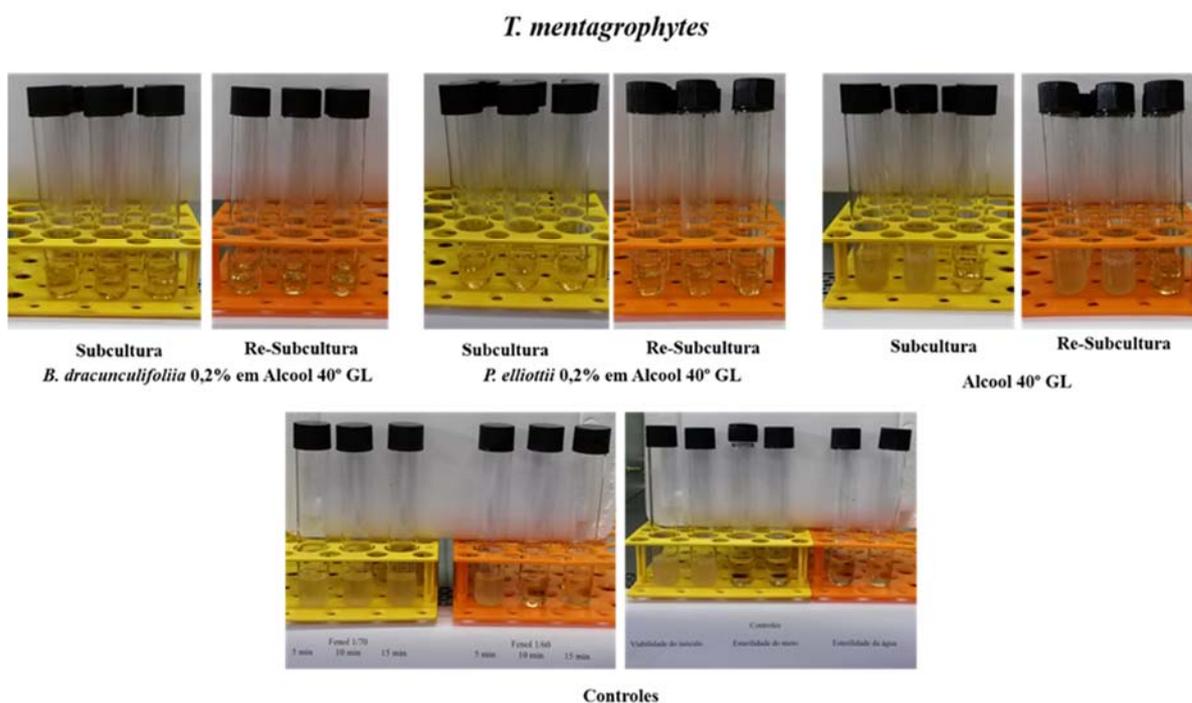


Figura 20. Avaliação da atividade desinfetante fungicida das soluções *B. dracunculifolia* 0,2% em álcool 40 °GL, *P. elliottii* 0,2% em álcool 40 °GL, avaliação do álcool 40°GL e os controles do experimento. Controle da suspensão de conídios frente solução de fenol 1/70 e 1/60, controle de viabilidade do meio de subcultura, controle de esterilidade do meio de subcultura e controle de esterilidade da água usada para o preparo das diluições de fenol.

Os ensaios também foram realizados utilizando-se a solução hidroalcoólica 40 °GL, sendo que a mesma não apresentou atividade desinfetante fungicida, pois não foi capaz de eliminar os conídios presentes na suspensão teste com 10 minutos de exposição, porém foi capaz de eliminar os mesmos com 15 minutos de exposição (Figura 20). Esses dados confirmam que a solução hidroalcoólica 40 °GL não é a responsável pela atividade desinfetante observada. Porém, o álcool deve atuar como um adjuvante à ação dos extratos adicionados. Como já foi discutido para a atividade do mesmo para os ensaios de atividade bactericida, a utilização de álcoois em baixa concentração é muito comum em se tratando de produtos antissépticos e como potencializadores de ação de biocidas, pois concentrações abaixo de 50% não são consideradas antimicrobianas, mas podem ser utilizadas como adjuvantes.

4.22 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DA SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA DO EXTRATO DE *B. dracunculifolia* A 0,2% EM ÁLCOOL A 40 °GL

Para avaliação da atividade micobactericida realizou-se o teste presuntivo frente a micobacteria *M. smegmatis* como descrito no item 3.27. Os ensaios foram realizados no Laboratório de pesquisa em Microbiologia Aplicada- Universidade de Franca (LaPeMA-Unifran), sob a supervisão do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

O primeiro teste presuntivo realizado apresentou resultado satisfatório, ou seja, a solução teste foi capaz de eliminar a contaminação por *M. smegmatis* frente os 20 cilindros testados. Porém, os testes foram realizados em replicata e os dois testes presuntivos consecutivos apresentaram resultado insatisfatório, com crescimento de micobactéria nos tubos de subcultura.

Como forma de avaliação, visto que um dos testes presuntivos apresentou resultado satisfatório, procedeu-se ao teste confirmatório que apresentou resultado negativo, pois a solução não foi capaz de eliminar a contaminação sobre os 10 cilindros contaminados com culturas de *M. bovis*.

4.23 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESINFETANTE ESPOROCIDA

Para realizar a avaliação da atividade desinfetante esporocida utilizou-se a solução hidroalcoólica contendo 0,2 % de extrato de *B. dracunculifolia* em álcool 40 °GL. Para realização dos ensaios utilizaram-se 30 cilindros carreadores para cada um dos micro-organismos testados, sendo 10 cilindros para cada tempo de exposição avaliado que foram de 5, 15 e 30 minutos. Os ensaios demonstraram que a solução hidroalcoólica contendo 0,2% de extrato de *B. dracunculifolia* em álcool 40 °GL não possui atividade esporocida frente a nenhum dos micro-organismos testados (Figura 21).

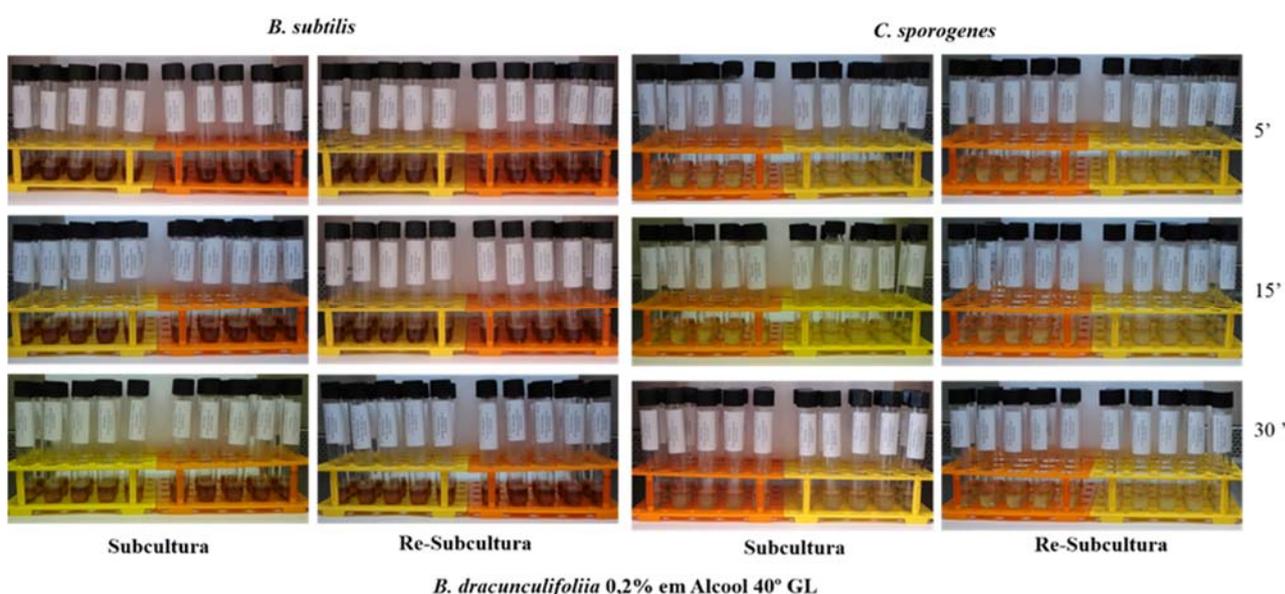


Figura 21. Avaliação da atividade esporocida da solução hidroalcoólica contendo extrato de *B. dracunculifolia* 0,2% em álcool 40°GL, frente aos micro-organismos *B. subtilis* e *C. sporogenes*, após os tempos de 5, 10 e 15 minutos de exposição.

Avaliando-se os resultados obtidos in vitro para a determinação da CIM que o extrato de *P. Elliottii* apresentou frente a *B. subtilis* (CIM 25 µg/mL), aventou-se a possibilidade de que a associação dos extratos de *P. Elliottii* ao extrato de *B. dracunculifolia* em solução pudesse proporcionar uma melhora na atividade observada. Assim ensaios foram realizados utilizando-se as soluções:

- Solução hidroalcoólica contendo 0,1% de extrato de *P. Elliottii* em álcool 40°GL.
- Solução hidroalcoólica contendo 0,2% de extrato de *P. Elliottii* em álcool 40°GL.

- Solução hidroalcoólica contendo 0,2 % de extrato de *B. dracunculifolia* associado a 0,1% de extrato de *P. elliottii* em álcool 40 °GL

- Solução hidroalcoólica contendo 0,2 % de extrato de *B. dracunculifolia* associado a 0,2% de extrato *P. elliottii* em álcool 40 °GL.

Os ensaios foram realizados somente frente ao micro-organismo *B. subtilis*, utilizando-se 10 cilindros carreadores para cada uma das soluções testadas, com um tempo de exposição dos cilindros à solução de 30 minutos. Os resultados mostraram-se insatisfatórios, visto que houve crescimento do micro-organismo em todos os tubos de subcultura e re-subcultura frente todas as soluções as quais foram expostos os cilindros carreadores (Figura 22). Todos os controles necessários ao teste apresentaram-se dentro dos padrões exigidos para considerar os ensaios válidos.

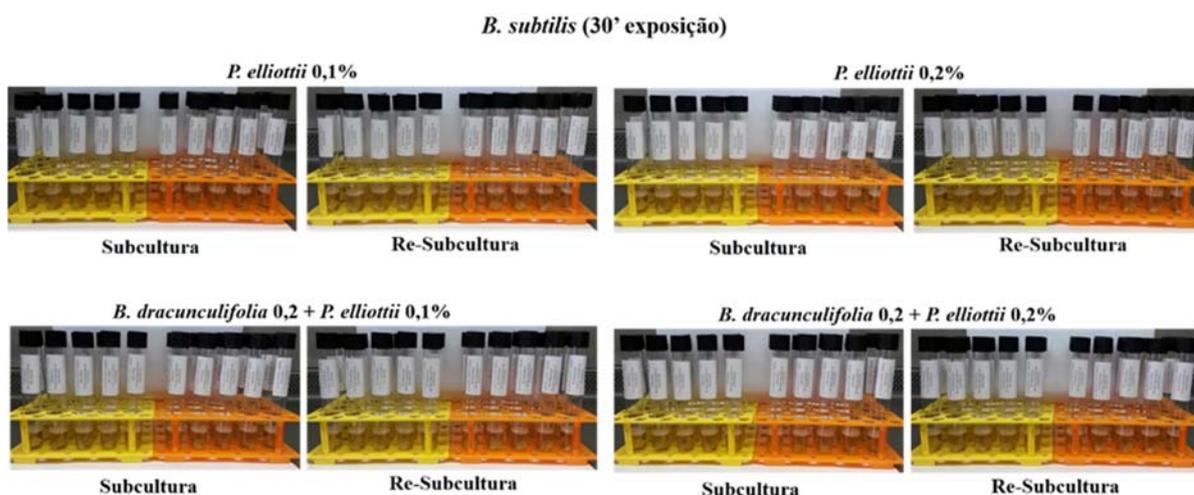


Figura 22. Avaliação da atividade esporocida da solução hidroalcoólica contendo extrato de *P. elliottii* 0,1% em álcool 40°GL, solução hidroalcoólica contendo extrato de *P. elliottii* 0,2% em álcool 40°GL e associações dos mesmos a 0,2 % de extrato de *B. dracunculifolia*, frente ao micro-organismo *B. subtilis*, após 30 minutos de exposição.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico de *Baccharis dracunculifolia* e *Pinus elliottii* propiciou o isolamento de alguns metabólitos com atividade antimicrobiana, permitindo a identificação de alguns dos metabólitos presentes nos extratos destas espécies responsáveis pelas atividades contra os micro-organismos estudados.

A partir dos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que tanto o extrato de *B. dracunculifolia*, as frações e substâncias isoladas a partir do mesmo e os padrões adquiridos que comprovadamente se encontram como metabólitos da espécie, bem como o extrato de *P. elliotti* e o ácido deidroabiético isolado do mesmo, apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias e fungos avaliados. Porém, foram mais ativos frente às bactérias Gram+, visto que resultados positivos foram observados frente ao bacilo Gram – *H. pylori*.

A associação dos extratos e frações de *B. dracunculifolia* e *P. elliotti* com antimicrobianos de uso clínico, frente às bactérias avaliadas trouxe resultados interessantes, principalmente quando se avalia a interação dos mesmos com antifúngicos. Destacando-se os excelentes resultados apresentados para todos os extratos e frações avaliados quando associados ao fluconazol, frente a *C. albicans*, demonstrando que os extratos e frações avaliados possuem potencial para serem utilizados como adjuvantes para o tratamento de infecções por esse patógeno.

Verificou-se também que a espécie *B. dracunculifolia* possui potencial para ser utilizada em solução como agente desinfetante sobre bactérias e fungos patogênicos. Porém, não foi efetiva frente às micobactérias e esporos bacterianos.

O extrato de *P. elliottii* também apresentou potencial para ser utilizado em solução como desinfetante de ação fungicida.

Conclui-se que as duas espécies possuem potencial para serem utilizadas em produtos com ação antimicrobiana, seja para utilização tópica ou sistêmica e em produtos sanitizantes.

Referências Bibliográficas

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M. J., BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **Archive for Organic Chemistry**, issue in honor of Prof. Atta-ur-Rahman, p. 76-96, 2007.

ADAMS, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy*. Carol Stream, Illinois: **Allured Publishing Corporation**, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares. Diário oficial da União, Brasília, 1988.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 210, de 4 de agosto de 2003. Determinar a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no **Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos**. Diário oficial da União, Brasília, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do MERCOSUL através da Resolução GMC nº 50/06, que consta em Apêndice a presente Resolução. Diário oficial da União, Brasília, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada nº 33, de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre a proibição de registro de novos produtos saneantes na categoria “esterilizantes” para aplicação sob a forma de imersão, a adequação dos produtos esterilizantes e desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos já registrados na ANVISA e dá outras providências. Diário oficial da União, Brasília, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada nº 35, de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre o Regulamento técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos. Diário oficial da União, Brasília, 2010.

AGUIAR, S. C.; ZEOULA, L. M.; FRANCO, S. L.; PERES, L. P.; ARCURI, P. B.; FORANO, E. Antimicrobial activity of Brazilian propolis extracts against rumen bacteria *in vitro*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, p. 1951-1959, 2013.

AHMED, M.; DJEBLI, N.; AISSAT, S.; ZERROUKI, K.; BOURABEH, A. *In vitro* synergistic antibacterial activity of natural honey combined with curcuma starch and their correlation with diastase number, flavonoid and polyphenol content. **Plant Pathology and Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2013.

AL-BAYATI, F. A. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 403–406, 2008.

ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SOUZA, E. B.; LINS, M. U. D. S.; NOGUEIRA, N. A. P.; LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. **Archive for Organic Chemistry**, Issue in Honor of Prof. Otto Gottlieb, p. 59-65, 2004.

ALEIXO, A. A.; HERRERA, K. M. S.; RIBEIRO, R. I. M. A.; LIMA, L. A. R. S.; FERREIRA, J. M. S. Antibacterial activity of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja) against bacteria of medical interest. **Revista Ceres da Universidade Federal de Viçosa**, v. 60, n. 5, p. 731-734, 2013.

ANTHONY, T.; RAJESH, T.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Influence of medium components and fermentation conditions on the *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 872 - 877, 2009.

APPELBAUM, P. C. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 5, p. 398-408, 2007.

ARESB, Associação dos Resinadores do Brasil. <http://www.aresb.com.br/index.html>, último acesso em 7 de julho de 2014.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n. 3, p. 230-234, 2000.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; ISHII, E.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v. 8, n. 1, p. 16-23, 2001.

BARROSO, G.; Compositae: Subtribo *Baccharidinae* Hoffmann. Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. **Rodriguesia**, v.40, 271 p, 1976.

BASTOS, E. M. A. F. Origem Botânica e Indicadores de Qualidade da “Própolis Verde” Produzida no Estado de Minas Gerais, Brasil. 2001. 137p. Tese de Doutorado. **Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2001.

BECHARA, F. C. (2003) Restauração ecológica de restingas contaminadas por *Pinus* no Parque Florestal do Rio Vermelho, SC. Dissertação de mestrado. **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 125p.

BERNARDI, E.; PRADO, G. M.; AGNES, S. I. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo e extratos de *Pinus pinaster* sobre *Streptococcus sp.* **Anais do I Seminário Internacional de Ciência, Tecnologia e Ambiente**, UNIOESTE, Cascavel – PR, 2009.

BERTHOD, A. Countercurrent Chromatography or Centrifugal Partition Chromatography. **Cheminform**, v. 22, n. 26, 1991.

BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; DI STASI, L. C.; JUNIOR, A. F. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 101, n.4, p. 387-390, 2006.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; GRENZ, M.; DHAR, A. K.; ROBINSON, H.; KING, R. M. Five diterpenes and other constituents from five *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v. 20, 281-286, 1981.

BOHLMANN, F.; BANNERJEE, S.; JAKUPOVIC, J.; GRENZ, M.; MISRA, L. N.; SCHEMEDA-HIRSCHMAN, G.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Clerodane and labdane diterpenoids from *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v. 24, n. 3, 511-515, 1985.

BOLISHACOVA, V. L.; DEMENKOVA, L. I.; SCHIMIDT, E. N.; PENTEGOVA, V. A. Neutral diterpenoids of oleoresins of five conifer species of Transcaucasia. **Chemistry of Natural Compounds**, v.6, p. 691-694, 1988.

BUGNO, A.; BUZZO, A. A.; PEREIRA, T. C. Avaliação da qualidade microbiológica de produtos saneantes destinados à limpeza. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 3, p. 335-340, 2003.

BUSH, K.; COURVALIN, P.; DANTAS, G.; DAVIES, J.; FISENSTEIN, B.; HOUVINEN, P.; JACOBY, G. A.; KISHONY, R.; KREISWIRTH, B. N.; KUTTER, E.; LERNER, S. A.; LEVY, S.; LEWIS, K.; LOMOVZKAYA, O.; MILLER, J. H.; MOBASHERY, S.; PODDOCK, L. J. V.; PROJAN, S.; THOMAS, C. M.; TOMASZ, A.; TULKENS, P. M.; WALSH, T. R.; WATSON, J. D.; WITKOWSKI, J.; WITTE, W.; WRIGHT, G.; YEH, P.; ZGURSKAYA, H. I. Tackling antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9: 894–896, 2011.

CARDOSO, M. J. O.; SILVA, S. D. C.; SOUZA, M. G. M.; AMBROSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S.; MARTINS, C. H. G. Evaluation of the antimicrobial activity of the resin-oil and fractions from *Pinus elliottii* against multi-resistant bacteria. **Annals of 8^o International Congress of Pharmaceutical Sciences/CIFARP**, Ribeirão Preto – SP, 2011.

CASTANHEIRO, J. E.; RAMOS, A. M.; FONSECA, I.; VITAL, J. The acid catalised reaction of α -pinene over molybdophosphoric acid ammobilised in dense polymeric membranes. **Catalysis Today**, v. 82, p. 187-193, 2003.

CASTRO, M. M. Estruturas secretoras em folhas de espécie da família Asteraceae: aspectos estruturais e histoquímicos. São Paulo, 1987, 203p. **Tese de doutorado. Universidade de São Paulo**.

CHUNG, P. Y.; NAVARATNAM, P.; CHUNG, L. Y. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, n. 25, p. 1-6, 2011.

CHAPUISAT, M., OPPLIGER, A., MAGLIANO, P., CHRISTE, P. Wood ants use resin to protect themselves against pathogens. **Proceeding of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 274, p. 2013-2017, 2007.

COBOS, M. I.; RODRIGUES, J. L.; OLIVA, M. de las M.; DEMO, M.; FAILLACI, S. M.; ZYGADLO, J. A. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Baccharis notoserghila*. **Planta Medica**, v. 67, p. 84-86, 2001.

COSTA, F. N.; *Sparattosperma lecanthum*: anatomia foliar e isolamento de flavonóides por cromatografia contracorrente, 163p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração em Química de Produtos Naturais). **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2009.

COURVALIN, P. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, suppl. 1, p. 25-34, 2006.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D. J. Natural Products: A Continuing Source of Novel Drug Leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

DABAGHI-BARBOSA, P.; ROCHA, A. M.; LIMA, A. F. C.; OLIVEIRA, B. H.; OLIVEIRA, M. B. M.; CARNIERI, E. G. S.; CADENA, S. M. S. C.; ROCHA, M. E. M. Hispidulin: Antioxidant properties and effect on mitochondrial energy metabolism. **Free Radical Research**, v. 39 (12), p. 1305-1315, 2005.

DENYER, S. P.; STEWART, G. S. A. B. Mechanisms of action of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p. 261-268, 1998.

DIGRAK, M.; ILÇIM, A.; ALMA, M. H. Antimicrobial Activities of Several Parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 584-587, 1999.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, supl. 1, p. 06-08, 2004.

ECDC/EMEA. Technical report: the bacterial challenge: time to react. **European Centre for Disease Prevention and Control/ European Medicines Agency Joint Working Group**, Stockholm, 42 p., 2009.

EJIM, L.; FARHA, M. A.; FALCONER, S. B.; WILDENHAIN, J.; COOMBES, B. K.; TYERS, M.; BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. **Nature Chemical Biology**, v. 7, p. 348-350, 2011.

EUI-JU, H., KI-JEUNG, Na., IN-GYU, C., KYUNG-CHUL, C., EUI-BAE, J. Antibacterial and Antifungal effects of essential oils from Coniferous trees. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27(6), p. 863-866, 2004.

FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. S.; DUTRA, L. B.; BOUZADA, M. L. M.; SCIO, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 183-189, 2011.

FERESIN, G. E.; TAPIA, A.; GIMENEZ, A.; RAVELO, A. G.; ZACCHINO, S.; SORTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 73 – 80, 2003.

FERESIN, G. E.; TAPIA, A.; LÓPEZ, S. N.; ZACCHINO, S. A. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 103-107, 2001.

FERRACINI, V. L.; PARAÍBA, L.C.; LEITÃO FILHO, H. F.; DA SILVA, A. G.; NASCIMENTO, L. R., MARSAIOLI, A. J. Essential oils of seven brazilian *Baccharis* species. **Journal of Essencial Oil Research**, v.7, p. 355-367, 1995.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 224-230, 2007.

FFNSC GC/MS Library Ver.1.3. **Flavor and Fragrance Natural and Synthetic Compounds For Shimadzu GCMS-QP2010 Series**.

FISCHER, N.; WEINREICH, B.; NITZ, S.; DRAWERT, F. Applications of high-speed counter-current chromatography for the separation and isolation of natural products. **Journal of Chromatography**, v. 538, p.193-202, 1991.

FOCAULT. A.P., CHEVOLOT. L. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. **Journal of Chromatography A**. v.808, p. 3-22, 1998.

FOCAULT, A.P. Centrifugal Partition Chromatography, **Chromatographic Science Series** v. 68, Marcel Dekker, New York, 1994.

FRAISE, A. P. Choosing disinfectants. **Journal of Hospital Infection**, v. 43, p. 255-264, 1999.

GAO, H.; LUO, C.; WANG, L.; QANG, J.; ZHENG, B.; PENG, Y.; ZHOU, L. Preparative separation of 3-O-methylkaempferol from *Caragana leucophloea* by high-speed counter-current chromatography and its antimicrobial activity. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 11, 2081-2087, 2012.

GELINSKI, J. M. L. N.; ROSA, J. C. D.; DUQUESNE, E. F. A. P.; BARATTO, C. M. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) e de seu composto ativo nerolidol em combinação com EDTA ou lisozima. **Evidência – Ciência e Biotecnologia- Interdisciplinar**, v. 7, n. 2, p. 131-144, 2007.

GIGANTE, B.; SILVA, A. M.; MARCELO CURTO, M.J.; SAVLUCHINSKE FEIO, S.; ROSEIRO, J. C.; REIS, V.R. Structural effects on the bioactivity of dehydroabietic acid derivatives. *Planta Medica*, v. 68, p.680–684, 2002.

GOODMAN & GILMAN, As bases farmacológicas da terapêutica/editores responsáveis, Joel G. Hardman, Lee E. Limbird; editor-consultor, Alfred Goodman Gilman. Rio de Janeiro; McGraw-Hill, 2005.

GONZÁLES, M. A.; PÉREZ-GUAITA, D.; CORREA-ROYERO, J.; ZAPATA, B.; AGUDELO, L.; MESA-ARANGO, A.; BETANCUR-GALVIS, L. Synthesis and biological evaluation of dehydroabietic acid derivates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 811-816, 2010.

GRECCO, S. S.; DORIGUETO, A. C.; LANDRE, I. M.; SOARES, M. G.; MARTHO, K.; LIMA, R.; PASCON, R. C.; VALLIM, M. A.; CAPELLO, T. M.; ROMOFF, P.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H. G. Structural Crystalline Characterization of Sakuranetin — An Antimicrobial Flavanone from Twigs of *Baccharis retusa* (Asteraceae). **Molecules**, v. 19, p. 7528-7542, 2014.

HADAD, M.; ZYGADLO, J. A.; LIMA, B.; DERITA, M.; FERESIN, G. E.; ZACCHINO, S. A.; TAPIA, A. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential oil from *Baccharis grisebachii* Hieron (Asteraceae). **Journal of Chilean Chemical Society**, v. 52, n. 2, p. 1186-1189, 2007.

HE, L.; WU, Y.; LIN, L.; WANG, J.; WU, Y.; CHEN, Y.; YI, Z.; LIU, M.; PANG, X. Hispidulin, a small flavonoid molecule, suppresses the angiogenesis and growth of human pancreatic cancer by targeting vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Cancer Science**, v. 102, n. 1, p. 219-225, 2010.

HELLWIG, F. H. Studies on the trichomes of some Asteraceae (Compositae). **Flora**, v. 186, n.5, p. 425-444, 1992.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTIB, A. K.; DOBLEA, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v.15, p. 639–652, 2008.

HOWDEN, B. P.; DAVIES, J. K.; JOHNSON, P. D. R.; STINEAR, P. T.; GRAYSON, M. L. Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin- Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 99-139, 2010.

HUET, A. A.; RAYGADA, J. L.; MENDIRATTA, K.; SEO, S. M.; KAATZ, G. W. Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple *in vitro* exposures to biocides and dyes. **Microbiology**, v. 154, p. 3144-3153, 2008.

HURABIELLE, M.; EBERLE, J.; PARIS, M. Flavonoids of *Artemisia campestris*, ssp. glutinosa. **Journal of Medicinal Plant Research. Planta Medica**, v. 46, p. 124-128, 1982.

INÁCIO, M. O.; AGOSTINHO, P. F.; MARTINS, C. H. G. Estudo da atividade antibactericida do *Pinus elliottii* frente às bactérias cariogênicas. **Anais da 15ª Jornada de Biomedicina da Universidade de Franca**, p. 10, Franca – SP, 2011.

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz. Procedimento Operacional Padronizado nº 65.3210.007. Método de diluição de uso. Desinfetante – Bactericida. Rev 12. Rio de Janeiro 2011. 30p. (Manual de qualidade. Seção 4.3)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz. Procedimento Operacional Padronizado nº 65.3210.011. Método para avaliação da atividade fungicida de desinfetante. Rev 11. Rio de Janeiro 2011. 16p. (Manual de qualidade. Seção 4.3)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz. Procedimento Operacional Padronizado nº 65.3210.005. Método para avaliação da atividade esporocida. Rev 12. Rio de Janeiro 2011. 20p. (Manual de qualidade. Seção 4.3)

ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for highspeed countercurrent chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1065, p.145-168, 2005.

JOHANN, S.; OLIVEIRA, F. B.; SIQUEIRA, E. P.; CISALPINO, P. S.; ROSA, C. A.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; COTA, B. B. Activity of compounds isolated from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) against *Pacacocidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 50, n. 8, p. 843-851, 2012.

KANLAYAVATTANAKUL, M; RUANGRUNGSI, N.; WATANABE, T.; ISHIKAWA, T. Chemical constituents of *Pterocaulon redolens*. **Heterocycles**, v. 61, p. 183-187, 2003.

KLOPELL, F. C.; LEMOS, M.; SOUSA, J. P.; COMUNELLO, E.; MAISTRO, E. L.; BASTOS, J. K.; DE ANDRADE, S. F. Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforschung. C. Journal of Biosciences**, v. 62, n. 7-8, p. 537-542, 2007.

KUBO, I. Recent applications of counter-current chromatography to the isolation of bioactive natural products. **Journal of Chromatography**, v. 538, p. 3-25, 1991.

KUMAZAWA, S., YONEDA, M., SHIBATA, I., KANEDA, J., HAMASAKA, T., NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p. 740–742, 2003.

KURDELAS, R. R.; LIMA, B.; TAPIA, A.; FERESIN, G. E.; SIERRA, M. G.; RODRÍGUEZ, M. V.; ZACCHINO, S.; ENRIZ, R. D.; FREILE, M. L. Antifungal activity of extracts and prenylated coumarins isolated from *Baccharis darwinii* Hook & Arn, (Asteraceae), **Molecules**, v. 15, p. 4898-4907, 2010.

LANGENHEIM, J. Plant Resins: **Chemical Evolution Ecology Ethnobotany**. Oregon: Timber Press, Inc, 586p. , 2003.

LANGEVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. J. A.; BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical Review in Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76-94, 2014.

LEE, JEONG-HU; LEE, BYUNG-KYU; KIM, JONG-HEE; LEE, S. H.; HONG, SOON-KWANG. Comparison of Chemical Compositions and Antimicrobial Activities of Essential Oils from Three Conifer Trees; *Pinus densiflora*, *Cryptomeria japonica*, and *Chamaecyparis obtusa*. **Journal of Microbiology and Biotchnology**, v. 14, n. 9, p. 391-396, 2009.

LEHTINEN, J. & LILIUS, ESA-MATTI. Promethazine renders *Escherichia coli* susceptible to penicillin G: real-time measurement of bacterial susceptibility by fluoro-luminometry. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 44-51, 2007.

LEITÃO, G. G. Uso de cromatografia contracorrente na obtenção de padrões de origem vegetal. **Revista Fitos**, v.1, p.48-52, 2005.

LEITÃO, D. P. S.; SILVA FILHO, A. A.; POLIZELLO, A. C. M.; BASTOS, J. K.; SPADARO, A. C. C. Comparative Evaluation of *In-Vitro* Effects of Brazilian Green Propolis and *Baccharis dracunculifolia* Extracts on Cariogenic Factors of *Streptococcus mutans*. **Biological and Parmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 1834-1839, 2004.

LEMOS, M. B.; SOUSA, M .P.; BARRETO, J. P.; SILVA FILHO, A. A.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.59, p.603–608, 2007.

LEUNG, A. Y.; FOSTER, S. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics, ed. 2; John Wiley; **New York**; p. 502-503, 1996.

LIU, S. W.; YU, S. T.; LIU, F. S.; XIE, C. X.; LI, L.; JI, K. H. Reactions of α -pinene using acid ionic liquid as catalysts. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 279, n. 2, p. 171-181, 2008.

MACHADO, T. R. M.; MALHEIROS, P. S.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido paracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 475 – 481, 2010.

MAJER J D, RECHER. H F. Are eucalypts Brazil's friend or foe? An Entomological viewpoint. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, p.185-200, 1999.

MARTIN, D. M.; GERSHENZON, J.; BOHLMANN, J. Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1586-1599, 2003.

MARTIN, D. M.; THOLL, D.; GERSHENZON, J.; BOHLMANN, J. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway Spruce stems. **Plant physiology**, v. 129, p. 1003-1018, 2002.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 181-194, 2006.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; Counter-current chromatography as a preparative tool – applications and perspectives. **Journal of Chromatography A**, v.658, p.315-341, 1994.

MARSHAL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, v.1, p.1311-1315, 1984.

MASSIGNANI, J. J.; LEMOS, M.; MAISTRO, E. L.; SCHAPHAUSER, H. P.; JORGE, R. F.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. Antiulcerogenic Activity of the Essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on Different Experimental Models in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1355-1360, 2009.

MAZUMDAR, K. DASTIDAR, S. G., PARK, J. H.; DUTTA, N. K. The anti-inflammatory non-antibiotic helper compound diclofenac: an antibacterial drug target. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.28, 881–891, 2009.

MISSIMA, F.; SILVA FILHO, A. A.; NUNES, G. A.; BUENOS, P. C. P.; SOUSA, J. P. B. BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. Effect of *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 463-468, 2007.

MORALES, G.; PAREDES, A.; SIERRA, P.; LOYOLA, L. A. Antimicrobial activity of three *Baccharis* species used in the traditional medicine of northern Chile. **Molecules**, v. 13, p. 790-794, 2008.

MOREIRA, F. P. M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A. B. P.; CARO, M. S. B.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Atividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 309-311, 2003.

NAGNOM, P.; CLEMENT, J. L. Terpenes from maritime pine (*Pinus pinaster*): toxins for subterranean termites of the genus *Reticulitermes*. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 18, p. 13-16, 1990.

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

NCCLS/CLSI Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. NCCLS document M38-A (ISBN 1-56238-470-8). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.

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

NEWMAN, D. J. *Natural products as leads to potential drugs: An old process or the new hope for drugs Discovery?* **Journal of Medical Chemistry**, v. 51, p. 2589-2599, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**. v.75, n.3, p. 311-335, 2012.

NIST08.LIB. National Institute of Standards and Technology /EPA/NIH Mass Spectral Library, Gaithersburg, 2008.

NOBLE, W.C., VIRANI, Z. and CREE, R. G.A. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 93, n. 2, p. 195–198, 1992.

NORDBERG, P.; MONNET, D. L.; CARS, O. Antibacterial drug resistance: options for concerted action. Geneva, Switzerland: **WHO Department of Medicines Policy and Standards**, World Health Organization, 2005.

NUÑEZ, L.; MORETTON, J. Disinfectant-resistant bacteria in Buenos Aires city hospital wastewater. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 644-648, 2007.

NUÑO, G.; ZAMPINI, I. C.; ORDOÑEZ, R. M.; ALBERTO, M. R.; ARIAS, M. E.; ISLA, M. I. Antioxidant/Antibacterial Activities of a Topical Phytopharmaceutical Formulation Containing a Standardized Extract of *Baccharis incarum*, an Extremophile Plant Species from Argentine Puna. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 1759-1767, 2012.

ONOFRE, S. B.; CANTON, M.; PIRES, P. A. Interference of extracts obtained from *Baccharis coridifolia* D. C. (Asteraceae- Astereae) action of antibiotics. **Public Health Research**, v. 3, n. 2, p. 18-23, 2013.

PALOMINO, J. C.; MARTIN A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.46, n.8, p. 2720-2722, 2002.

PARK, Y.K., PAREDES-GUZMAN, J.F., AGUIAR, C.L., ALENCAR, S.M., FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of the southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 1100–1103, 2004.

PAULI, G. F.; PRO, M. S.; FRIESEN, J. B. Countercurrent Separation of Natural Products (review). **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1489 – 1508, 2008.

PENNA, T. C. V.; MAZZOLA, P. G.; MARTINS, A. M. S. The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. **BioMed Central Infection Diseases**, v.1, n.16, 2001.

PEREIRA, A. C.; da COSTA, A. C. B. P.; MACHADO, A. K. S.; BELTRAME JÚNIOR, M.; ZÖLLNER, M. S. A.C.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Enzymatic Activity, Sensitivity to Antifungal Drugs and *Baccharis dracunculifolia* Essential Oil by *Candida* Strains Isolated from the Oral Cavities of Breastfeeding Infants and in Their Mothers' Mouths and Nipples. **Mycopatology**, v. 171, p. 103-109, 2011.

PHILLIPS, M. A.; CROTEAU, R. Resin-based defenses in conifers. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 5, p. 184-190, 1999.

PITTLER, E. E. Risk associated with herbal medicinal products. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 152, p. 183-189, 2002.

PROBST, I. S.; SFORCIN, J. M.; RALL, V. L. M.; FERNANDES, A. A. H.; FERNANDES JÚNIOR, A. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 17, n. 2, p. 159-167, 2011.

QUEIROGA, C. L.; FUKAI, A.; MARSAIOLI, A. J. Composition of the essential oil of Vassoura. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.1, n.3, p. 105-109, 1990.

RAHALISON, L.; BENATHAN, M.; MONOD, M.; FRENK, E.; GUPTA, M. P.; SOLIS, P. N.; FUZZATI, N.; HOSTETTMANN, K. Antifungal Principals of *Baccharis pedunculata*. **Planta Medica**, v. 61, n. 4, p. 360-362, 1995.

RAMOS, D. F.; LEITÃO, G. G.; COSTA, F. N.; ABREU, L.; VILLAREAL, J. V.; LEITÃO, S. G.; FERNÁNDEZ, S. L. S.; DA SILVA, P. E. A. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 669-674, 2008.

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

REJMANEK, M.; RICHARDSON, D. M. What attributes make some plant species more invasive? **Ecology**, v. 77, n. 6, p. 1655-1661, 1996.

RICHARDSON, D. M.; HIGGINS, S. I. Pines as invaders in the southern hemisphere. In: RICHARDSON, D. M. (ed.), **Ecology and biogeography of *Pinus***. Cambridge University Press. Cambridge, p. 450-473, 1998.

RODRIGUEZ, M. V.; SORTINO, M. A.; IVANCOVICH, J. J.; PELLEGRINO, J. M.; FAVIER, L. S.; RAIMONDI, M. P.; GATTUSO, M. A.; ZACCHINO, S. A. Detection of synergistic combinations of *Baccharis* extracts with Terbinafine against *Trichophyton rubrum* with high through putscreening synergy assay (HTSS) followed by 3D graphs. Behavior of some of their components. **Phytomedicine**, v. 20, p. 1230-1239, 2013.

ROMÃO, C. M. C. A.; MIYAZAKI, N. H. T.; MOTTA, L.L.F. Manual de saneantes: métodos para análise microbiológica de saneantes com ação antimicrobiana. Rio de Janeiro: **Fundação Oswaldo Cruz/ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**; 1991.

ROSAS-BURGOS, E. C.; CORTEZ-ROCHA, M. O.; PLASCENCIA-JATOMEA, M.; CINCO-MOROYOQUI, F. J.; ROBLES-ZEPEDA, R. E.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; SÁNCHEZ-MACHADO, D. I.; LARES-VILLA, F. The effect of *Baccharis glutinosa* extract on the growth of mycotoxigenic fungi and fumonisin B1 and aflatoxin B1 production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1025-1033, 2011.

SAKAGAMI, Y.; IINUMAB, M.; PIYASENAC, K. G. N. P.; DHARMARATNEC, H. R. W. Antibacterial activity of α -mangostin against vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) and synergism with antibiotics. **Phytomedicine**, V.12, 203–208, 2005.

SALAZAR, G. C. M.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A.; LULA, I. S. Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss: ^1H and ^{13}C chemical shift assignments. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v-38, p. 977-980, 2000.

SAN FELICIANO, A.; GORDALIZA, M.; SALINERO, M. A.; DEL CORRAL, J. M. M. Abietane Acids: Sources, Biological Activities, and Therapeutic Uses. **Planta Medica**, v. 59, p. 485-490, 1993.

SEGER, C.; EBERHART, T. K.; STURM, S.; STRASSER, H.; STUPPNER, H. Apolar chromatography on Sephadex LH-20 combined with high-speed counter-current chromatography, high yield strategy for structurally closely related analytes – destruxin derivatives from *Metarhizium anisopliae* as a case of study. **Journal of Chromatography A**. 1117, 67-73, 2006.

SEPÚLVEDA, B.; ASTUDILLO, L.; RODRÍGUEZ, J. A.; YÁÑEZ, T.; THEODULOZ, C.; SCHEMDA-HIRSCHMANN, G. Gastroprotective and cytotoxic effect of dehydroabietic acid derivatives. **Pharmacological Research**, n. 52, p. 429-437, 2005.

SILVA, S. D. C.; SOUZA, M. G. M.; CARDOSO, M. J. O.; ANBROSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S.; MARTINS, C. H. G. Antibacterial activity of the resin-oil and five fractions from *Pinus elliottii* against anaerobic buccal bacteria. **Annals of 8^o International Congress of Pharmaceutical Sciences/CIFARP**, Ribeirão Preto – SP, 2011.

SILVA FILHO, A. A.; SOUSA, J. P. B.; SOARES, S.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; GREGÓRIO, L. E.; NANAUAKKARA, N. P. D.; BASTOS, J. K. Antimicrobial activity extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asrereceae). **Zeitschrift fur Natursorschung**, v. 63c, p. 40-46, 2008.

SILVA FILHO, A. A. Estudo fitoquímico, de cultivo e das atividades biológicas de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae), a principal fonte botânica da própolis verde, 2006, 188p. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação da faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. **Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto.

SIMIONATTO, E.; ILHA, V.; MALMANN, A. S.; PORTO, C.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oil from *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 4, p. 366-368, 2008.

SIMONSEN, H. T.; RIEDEL, C.; GADE, L. B.; JEBJERG, C. P.; GUZMAN, A.; MOLGAARD, P. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Leaf Essential Oil of *Baccharis magellanica* (Lam.) Pers. and *Baccharis elaeoides* Remy From Chile. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 4, p. 377-380, 2009.

SMITH, E.; WILLIAMSON, E.; ZLOH, M.; GIBBONS, S. Isopimaric Acid from *Pinus nigra* shows Activity against Multidrug-resistant and EMRSA Strains of *Staphylococcus aureus*. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 538-542, 2005.

SÖDERBERG, T. A.; HOLM, S.; GREF, R.; HALLMANS, G. Antibacterial effects of zinc oxide, rosin, and resin acids with special reference to their interactions. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, v. 25, n. 1, p. 19-24, 1991.

SÖDERBERG, T. A.; GREF, R.; HOLM, S.; ELMROST, T.; HALLMANS, G. Antibacterial activity of rosin and resin acids *in vitro*. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, v. 24, n. 3, p. 199-205, 1990.

SOUTO de OLIVEIRA, S. M.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; COSTA, M. J.; de MELO DINIZ, M. F. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by extracts of mango (*Mangifera indica*) peel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 190-192, 2011.

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

SPRING, O. Chemotaxonomy based on metabolites from glandular trichomes. **Advances in Botanical Research**. v. 31, p. 153-174, 2000.

SULTAN, Md. Z.; JEON, YOUNG-MIN; MOON, SURK-SIK. Labdane-type diterpenes active against acne from Pine cones (*Pinus densiflora*). **Planta Medica**, v. 74, p. 449-452, 2008.

TAKAHASHI, J. A.; CASTRO, M. C. M.; SOUZA, G. G.; LUCAS, E. M. F.; BRACARENSE, A. A. P.; ABREU, L.M.; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA, M. S.; FLOREANO, M. B.; OLIVEIRA, T. S. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 18, n. 4, p. 198-204, 2008.

TASCETTO, A. P. D. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquosos e etanólicos de *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata* frente ao micro-organismo *Helicobacter pilory*. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação *strictu sensu*-Mestrado em Ambiente e Desenvolvimento. **Centro Universitário Univates. Lajeado – RS**, 2010.

TEIXEIRA, K. S. S.; DAHER, G. L.; OLIVEIRA, A. S. A. E. Avaliação da ação antimicrobiana de desinfetantes utilizados em uma indústria químico-farmacêutica. **REVISTA CIENTÍFICA FAECE SAÚDE/ Faculdade de Ensino e Cultura do Ceará**, p. 21-28, 2012.

TÓRO, M. R.; GESSNER, A. A. F.; FURTADOS, N. A. J. C.; CECCARELLI, P. S.; ALBUQUERQUE, S. BASTOS, J. K. Activity of *Pinus elliottii* resin compounds against *Lernaea cyprinacea* *in vitro*. **Veterinary Parasitology**, v. 118, p. 143-149, 2003.

TOROGLU, S. *In-vitro* antimicrobial activity and synergistic/antagonistic effect of interactions between antibiotics and some spice essential oils. **Journal of Environmental Biology**, v. 32, p. 23-29, 2011.

TRAPP, S.; CROTEAU, R. Defensive resin biosynthesis in conifers. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 689-724, 2001.

UDWADIA, Z. F.; AMALE, R. A.; AJIBANI, K. K.; RODRIGUES, C. Totally drug resistant tuberculosis in India. **Clinical Infectious Diseases**, v.54, 579–581, 2011.

VALAREZO, E.; ROSILLO, M.; CARTUCHE, L.; MALAGÓN, O.; MENESES, M.; MOROCHO, V. Chemical composition, antifungal and antibacterial activity of the essential oil from *Baccharis latifolia* (Ruis & Pav.) Pers. (Asteraceae) from Loja, Ecuador. **Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 3, p. 233-238, 2013.

VANNINI, A. B.; SANTOS, T. G.; FLEMINGO, A. C.; PURNHAGEN, L. R. P.; LOURENÇO, L.A.; BUTZKE, E. T. B.; KEMPT, M.; BEGNINI, I. M.; REBELO, R. A.; DALMARCO, E. M.; BELLA CRUZ, A.; SCHMIT, A. P.; CRUZ, R. C. B.; YAMANAKA, C. N.; STEINDEL, M. Chemical characterization and antimicrobial evaluation of the essential oils from *Baccharis unicella* D.C. and *Baccharis semisserrata* D. C. (Asteraceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 6, p. 547-554, 2012.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATI, M. G. GÊNERO *Baccharis* (ASTERACEAE): ASPECTOS QUÍMICOS, ECONÔMICOS E BIOLÓGICOS. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VIDARI, G.; FINZI, P. V.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J.; ZAFRA, C.; CHIRIBOGA, X.; BERENGUER, B.; LA CASA, C.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; MARTIN, M. J. Antiulcer na Antidiarrhoeic effect of *Baccharis teindalensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 6, p. 405-411, 2003.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326- 337, 2006.

XIAO, D.; KUROYANAGI, M.; ITANI, T.; MATSUURA, H.; UDAYAMA, M.; MURAKAMI, M.; UMEHARA, K.; KAWAHARA, N. Studies on constituents from *Chamaecyparis pisifera* and antibacterial activity of diterpenes. **Chemical & Pharmacological Bulletin**, v. 49, n. 11, p. 1479-1481, 2001.

WADA, H.; KODATO, S. I.; KAWAMORI, M.; MORIKAWA, T.; NAKAI, H.; TAKEDA, M.; ONODA, Y.; TAMAKI, H. Antiulcer activity of dehydroabietic acid derivatives. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 4, p. 1472-1487, 1985.

WAGSCHAL, K.; SAVAGE, T. J.; CROTEAU, R. Isotopically Sensitive Branching as a Tool for Evaluating Multiple Product Formation by Monoterpene Cyclases. **Tetrahedron**, v. 47, n. 3, p. 5933-5944, 1991.

WARREN, J. R.; MARSHAL, B. Unidentified curve bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, v.1, p. 1273-1275, 1983.

WELLS, C. D.; CEGIELSKI, J. P.; NELSON, L. J.; LASERSON, K. F.; HOLTZ, T. H.; FINLAY, A.; CASTRO, K. G.; WEYER, K. HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis – the perfect storm. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, p. 86-106, 2007.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance, fact sheet 194**. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/> [ultimo acesso, 23 de junho de 2014].

YE, H.; SHEN, S.; XU, J.; LIN, S.; YUAN, Y.; JONES, G. S. Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacol against food-borne bacteria. **Food Control**, v. 34, p. 619-623, 2013.

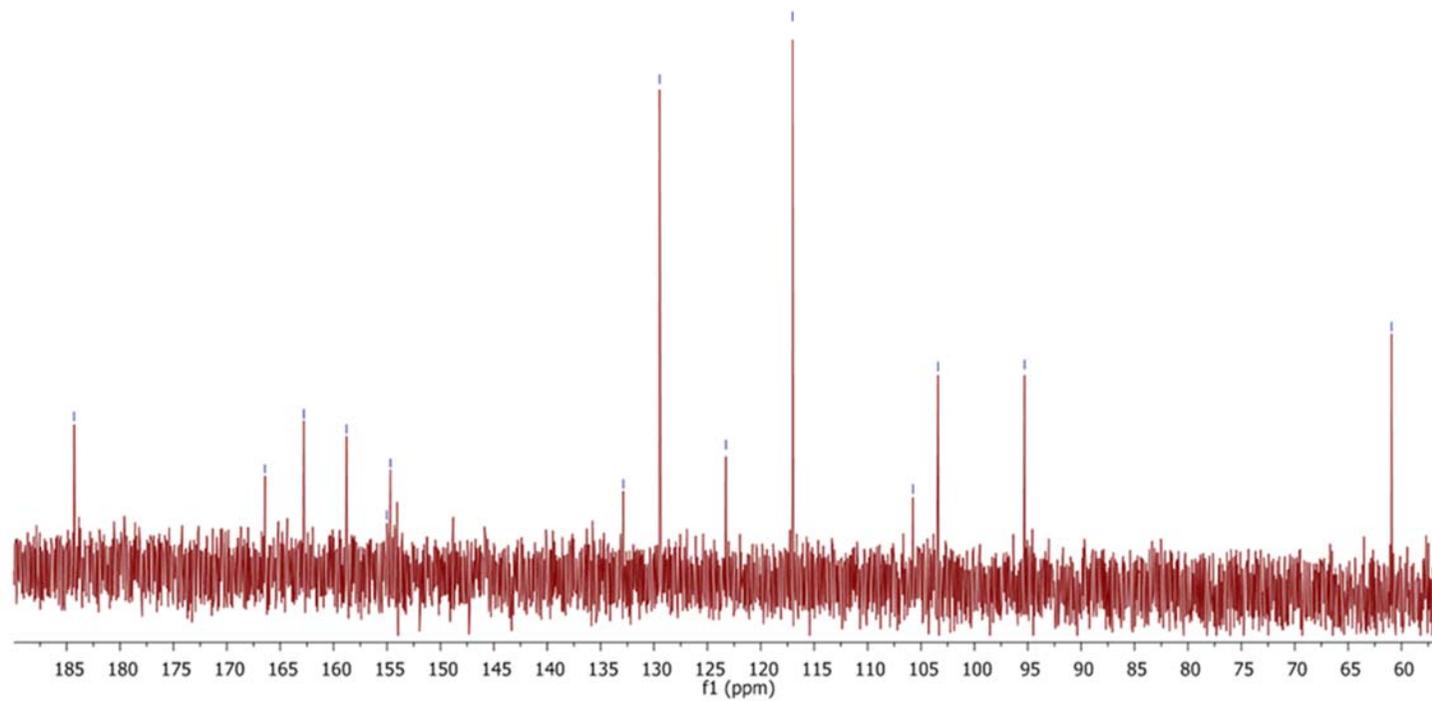
ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; JUNIOR, A. F. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n.4, p. 828-833, 2009.

ZAMPINI, I. C.; CUELLO, S.; ALBERTO, M. R.; ORDOÑEZ, R. M.; ALMEIDA, R. D.; SOLORZANO, E.; ISLA, M. I. Antimicrobial activity of selected plant species from “the Argentine Puna” against sensitive and multi-resistant bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 499-505, 2009a.

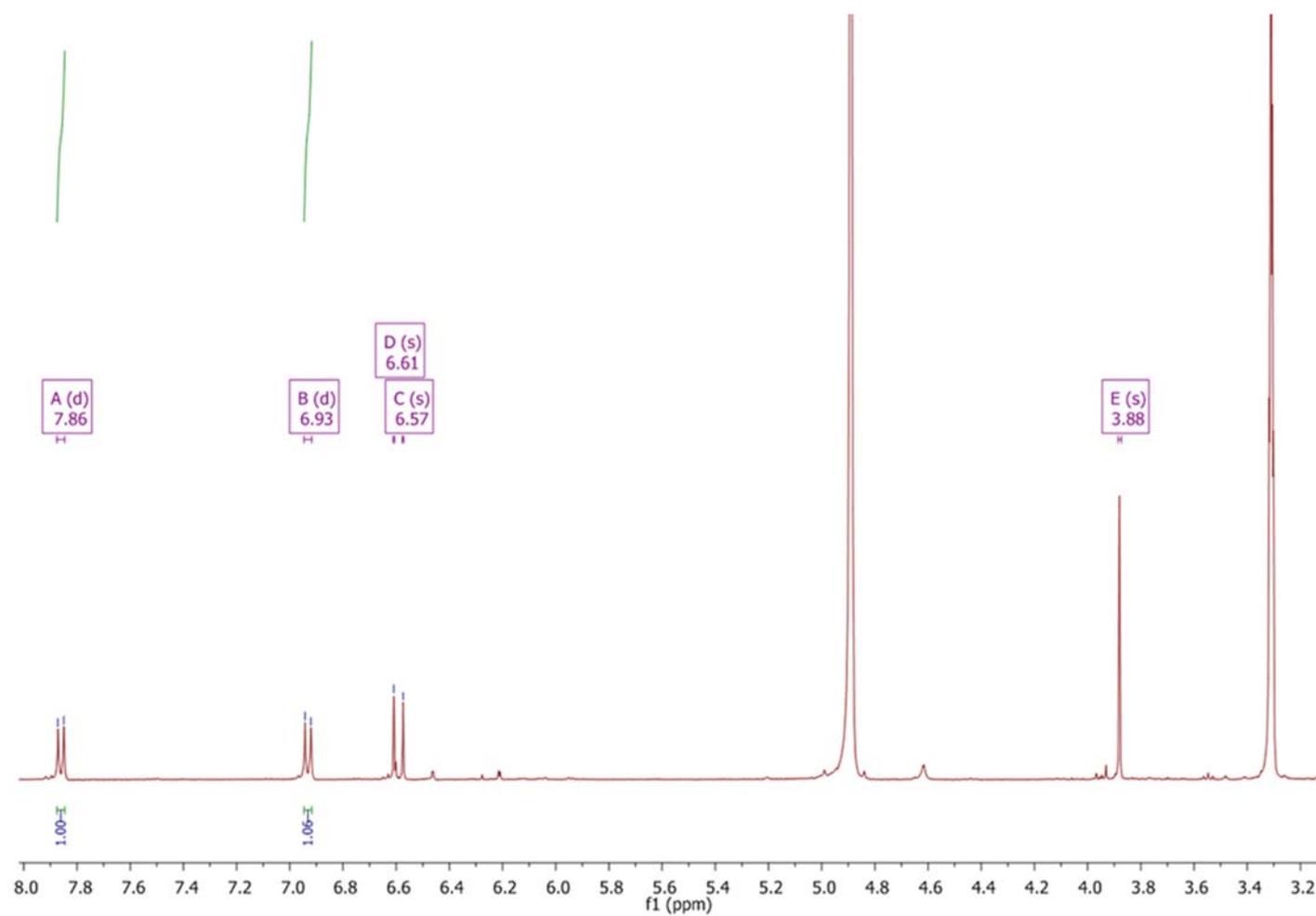
ZAMPINI, I. C.; ISLA, M. I.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Antimicrobial and antioxidant compounds from the infusion and methanolic extract of *Baccharis incarum* (WEDD.) Perkins. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 54, n. 4, p. 477-481, 2009b.

Apéndice

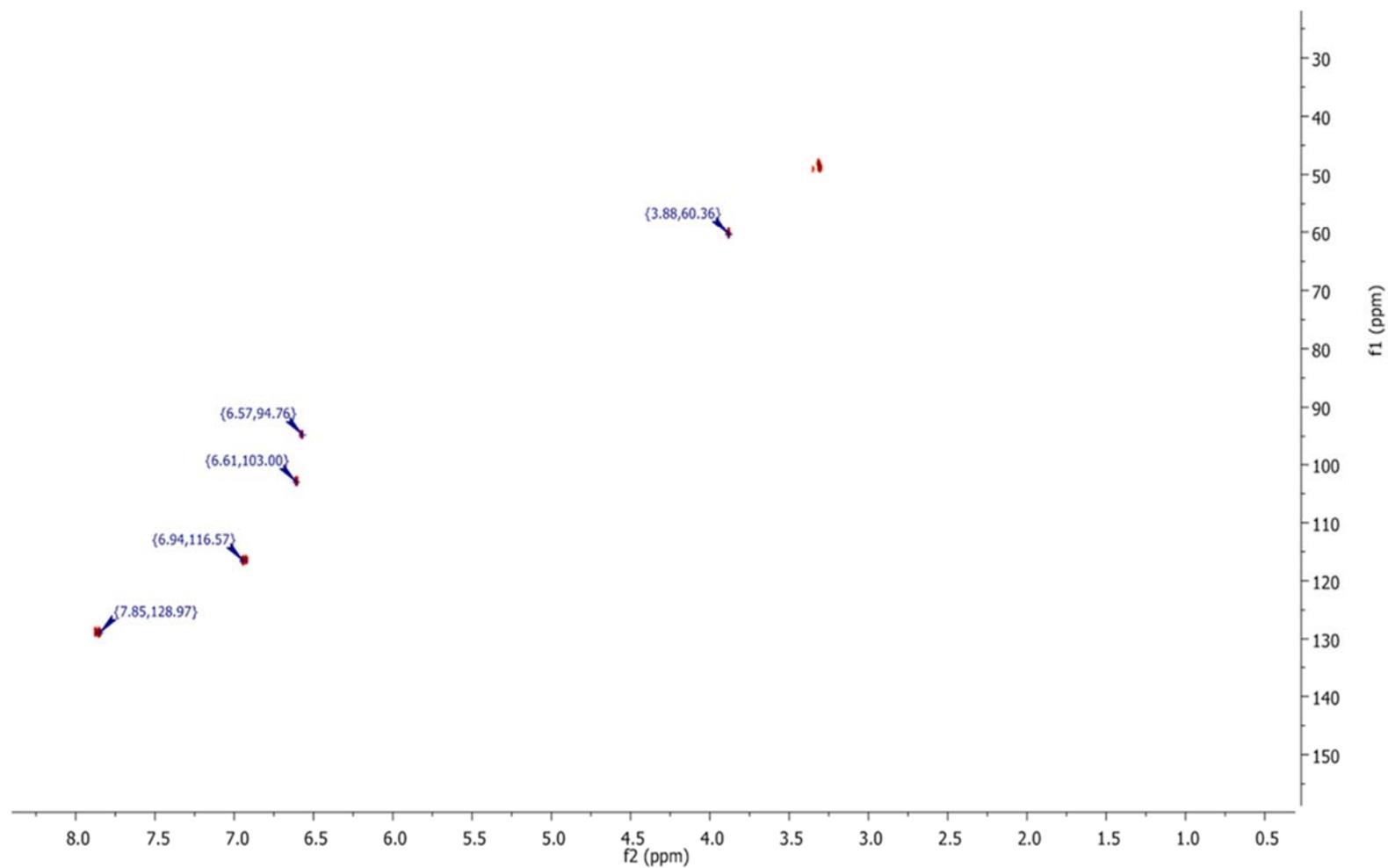
7 APÊNDICE



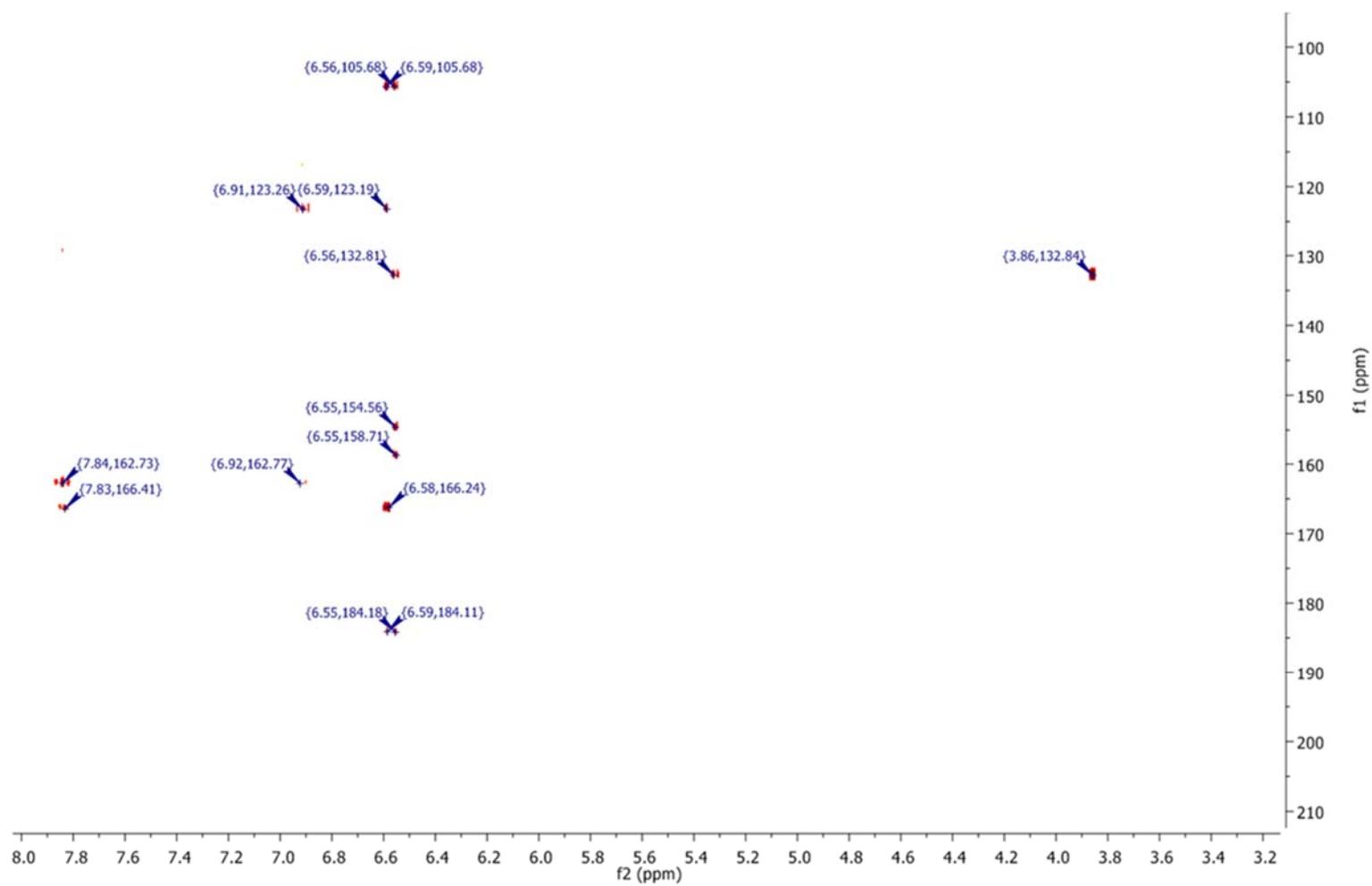
Apêndice 1. Espectro de RMN de ^{13}C da substância BD-1 (hispidulina) (100 MHz, CD_3OD).



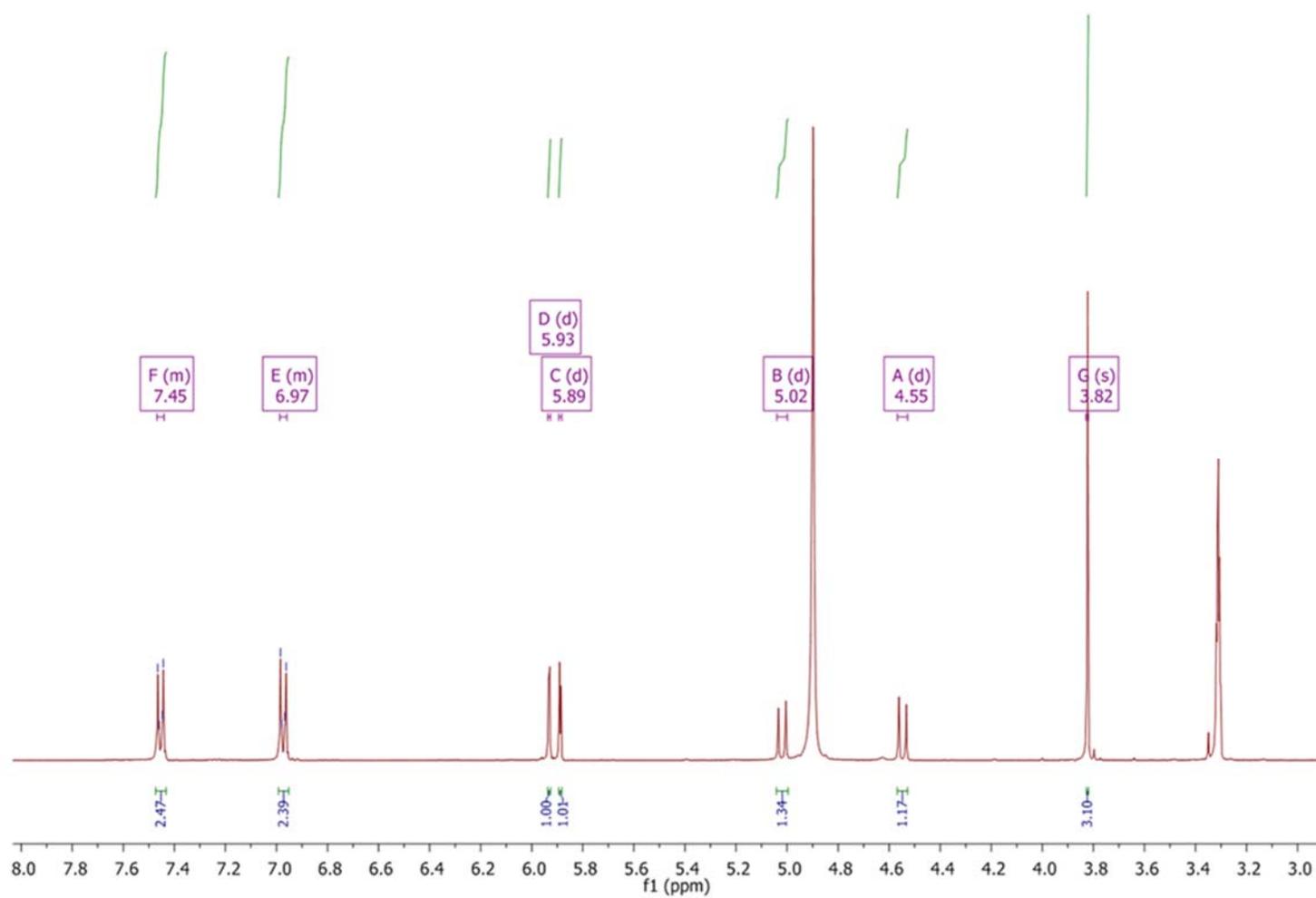
Apêndice 2. Espectro de RMN de ^1H da substância BD-1 (hispidulina) (400 MHz, CD_3OD).



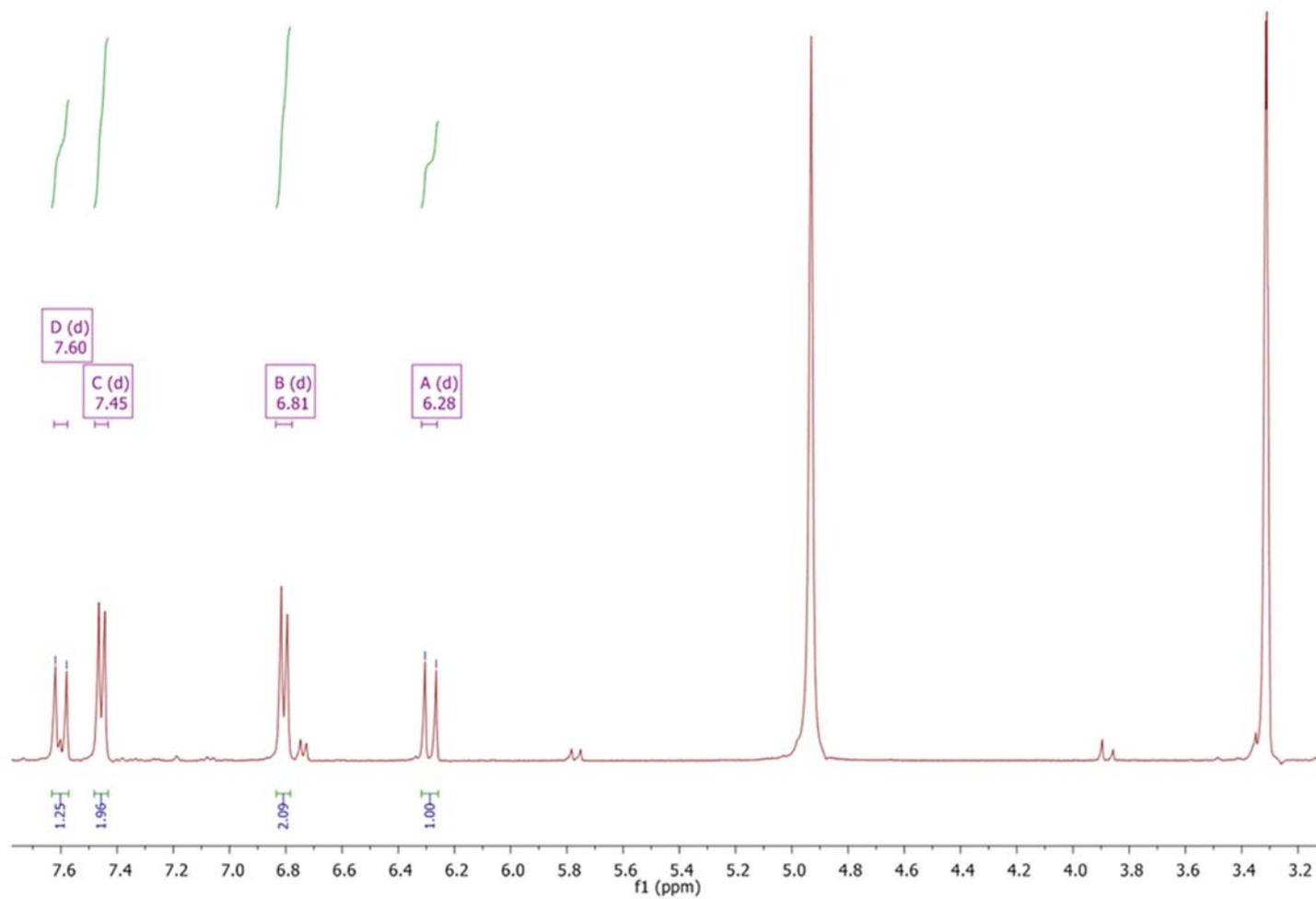
Apêndice 3. Espectro de HMQC da substância BD-1 (hispidulina) (H: 400 MHz, C: 100 MHz, CD₃OD).



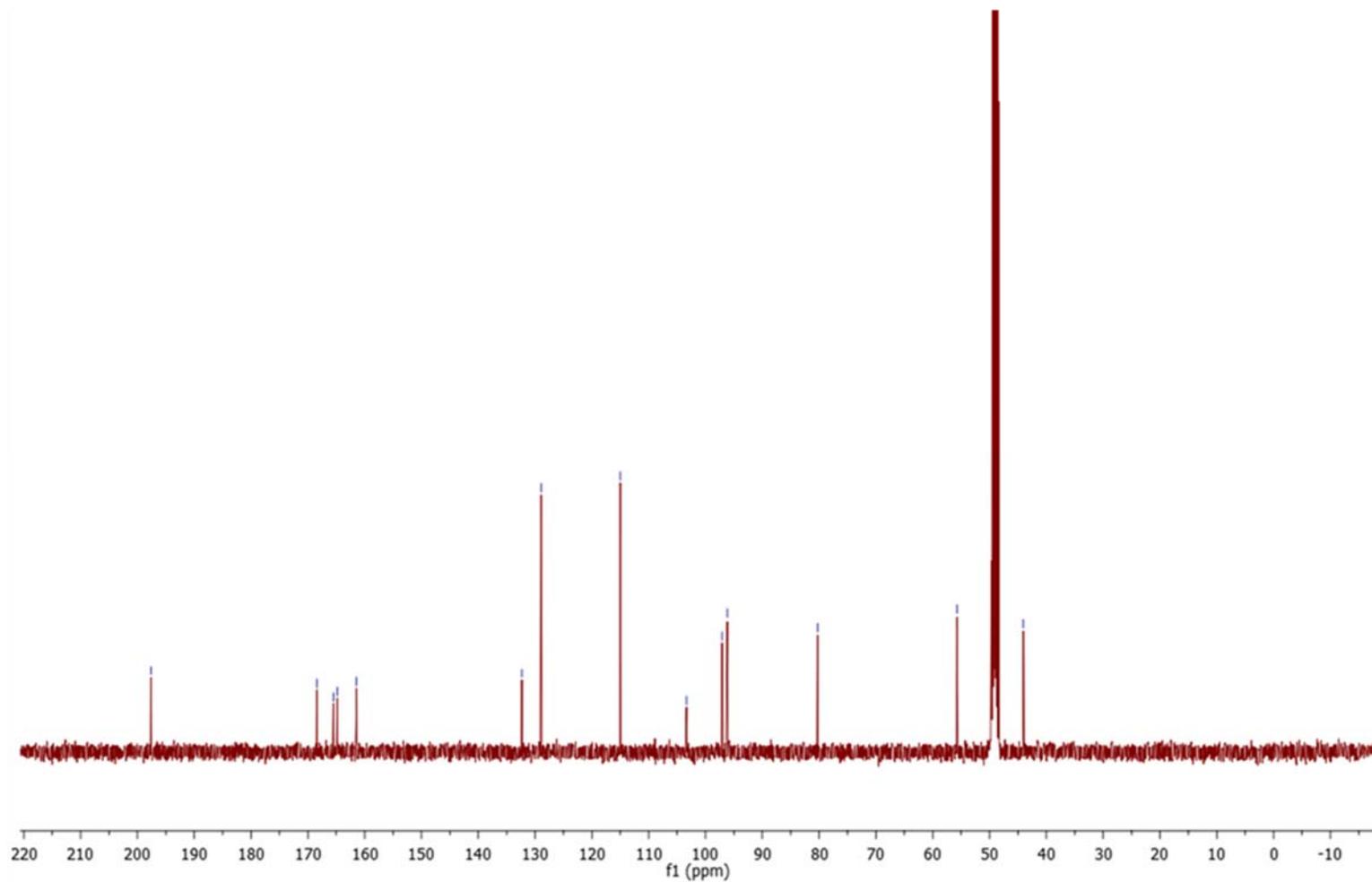
Apêndice 4. Espectro de HMBC da substância BD-1 (hispidulina) (H: 400 MHz, C: 100 MHz, CD₃OD).



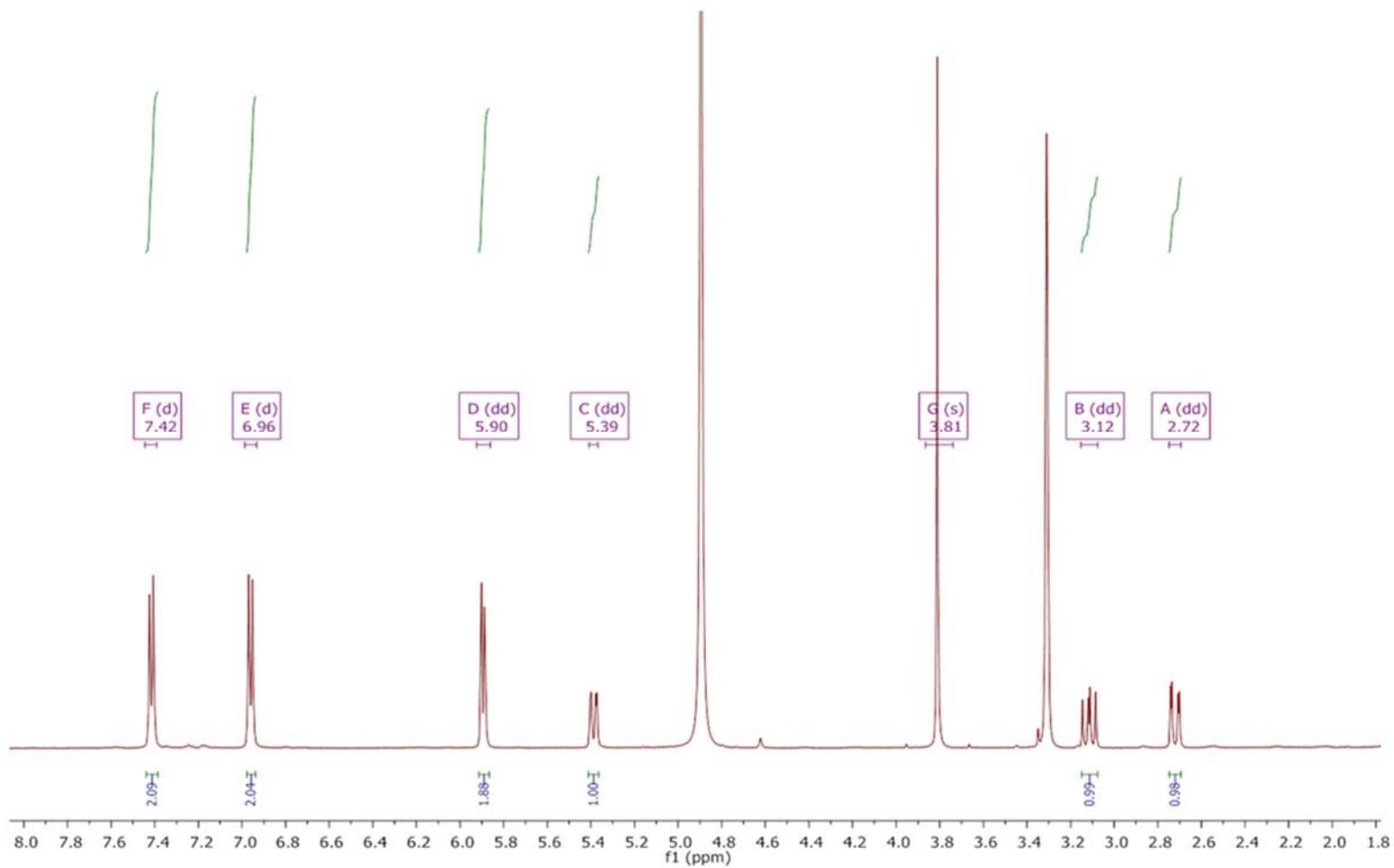
Apêndice 5. Espectro de RMN de ^1H da substância (aromadendrina-4'-*O*-metil-éter) BD-2 (400 MHz, CD_3OD).



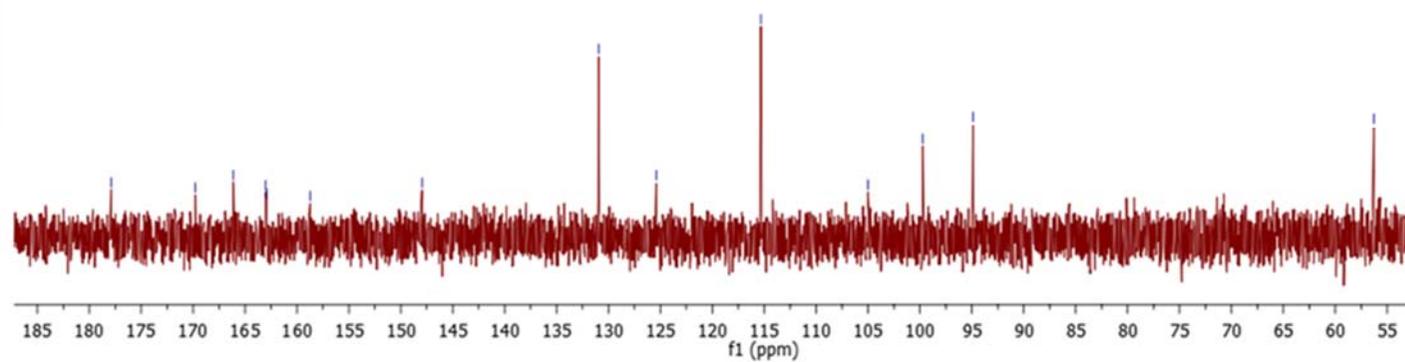
Apêndice 6. Espectro de RMN de ^1H da substância BD-3 (ácido *p*-cumárico) (400 MHz, CD_3OD).



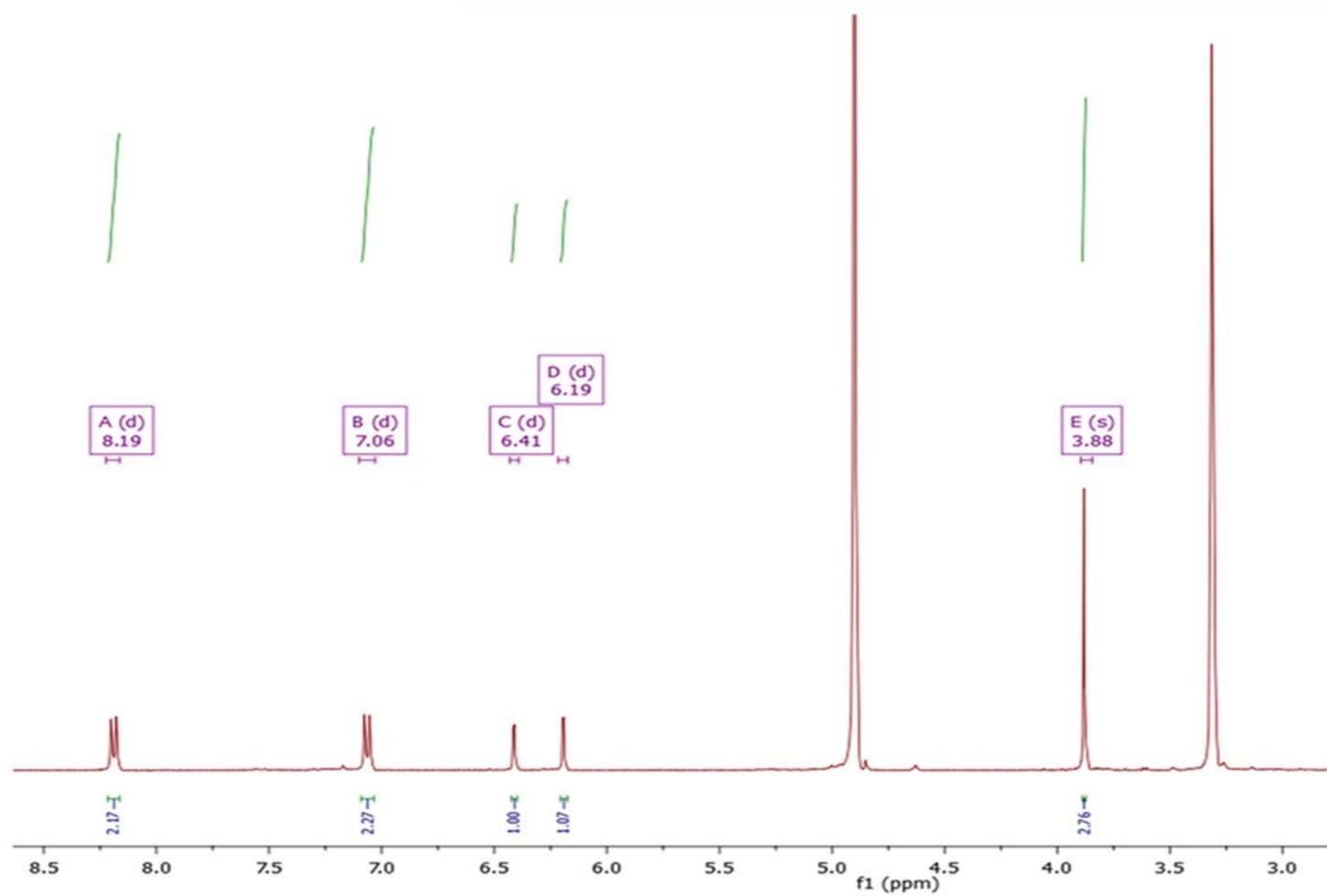
Apêndice 7. Espectro de RMN de ¹³C da substância Bdl-1 (isosakuranetina) (100 MHz, CD₃OD).



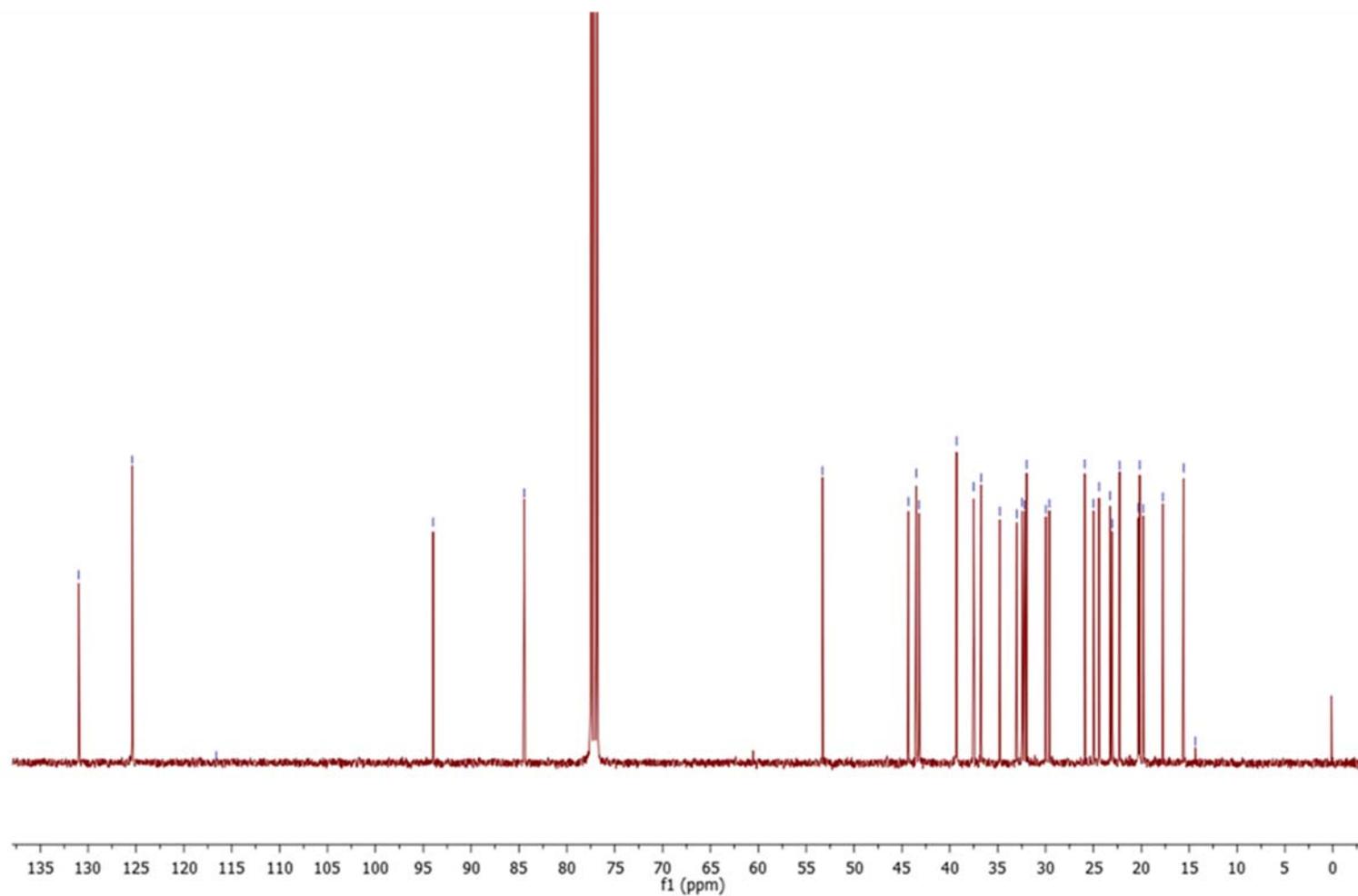
Apêndice 8. Espectro de RMN de ^1H da substância Bdl-1 (isosakuranetina) (400 MHz, CD_3OD).



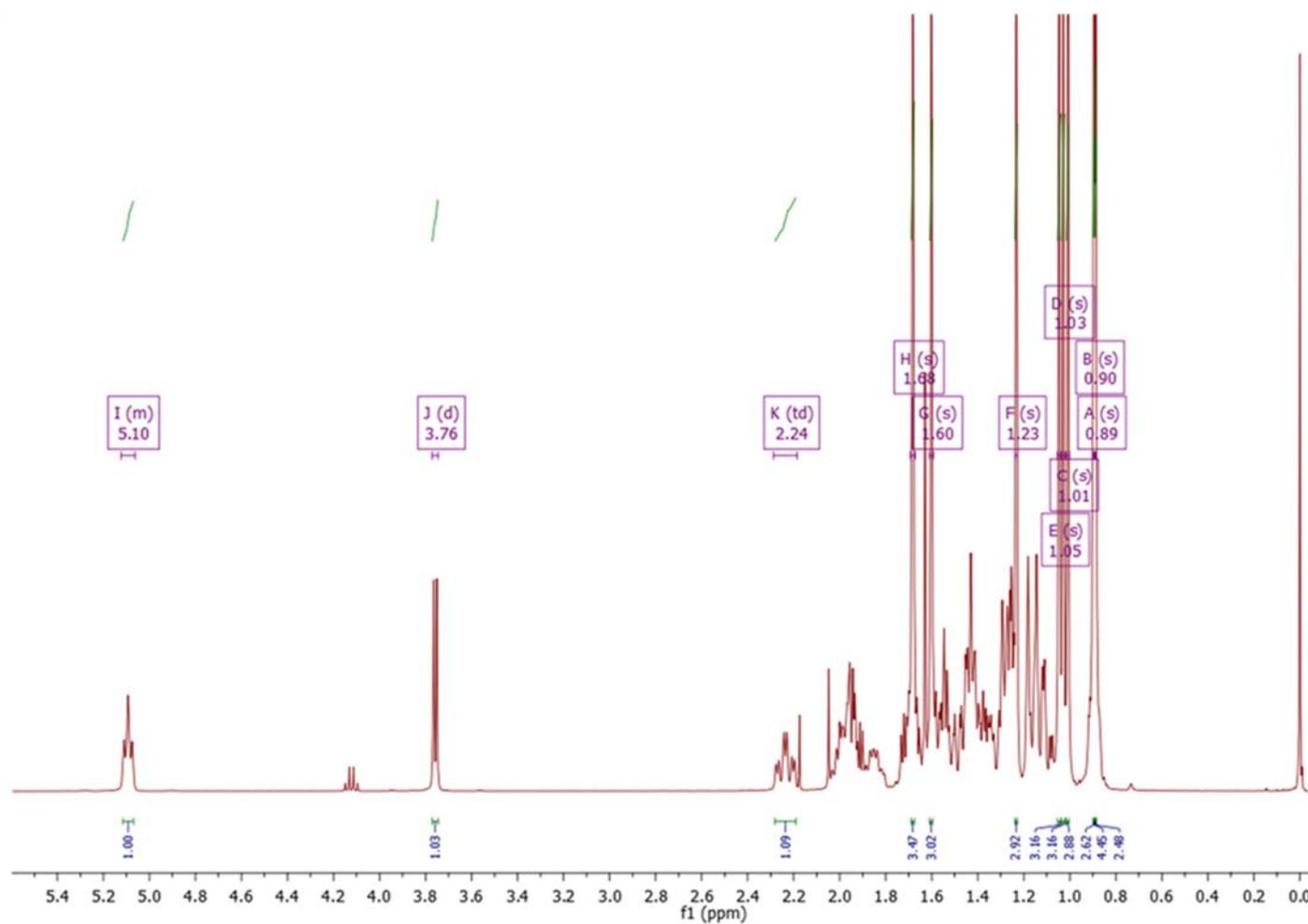
Apêndice 9. Espectro de RMN de ¹³C da substância Bdl-2 (3-*O*-metil-kaempferol) (100 MHz, CD₃OD).



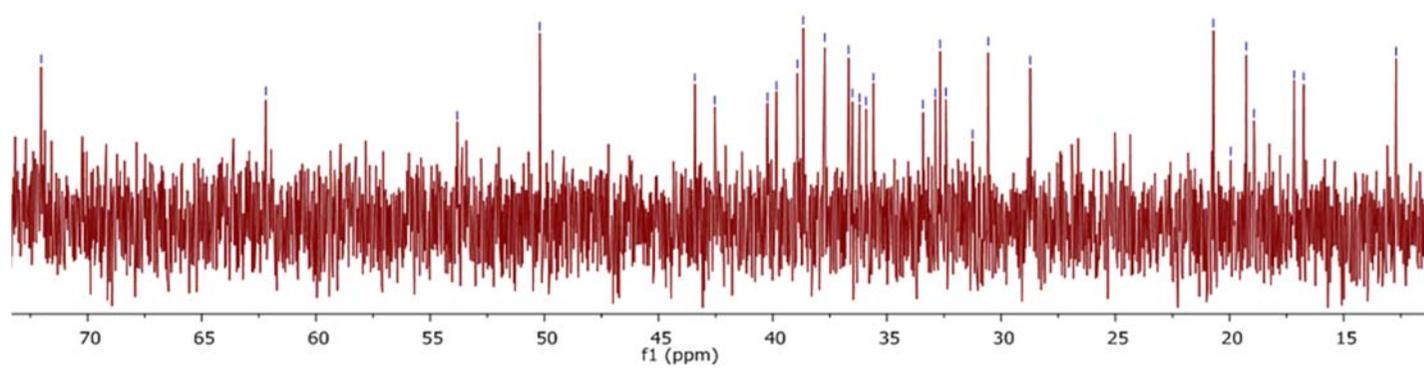
Apêndice 10. Espectro de RMN de ^1H da substância Bdl-2 (3-O-metil-kaempferol) (400 MHz, CD_3OD).



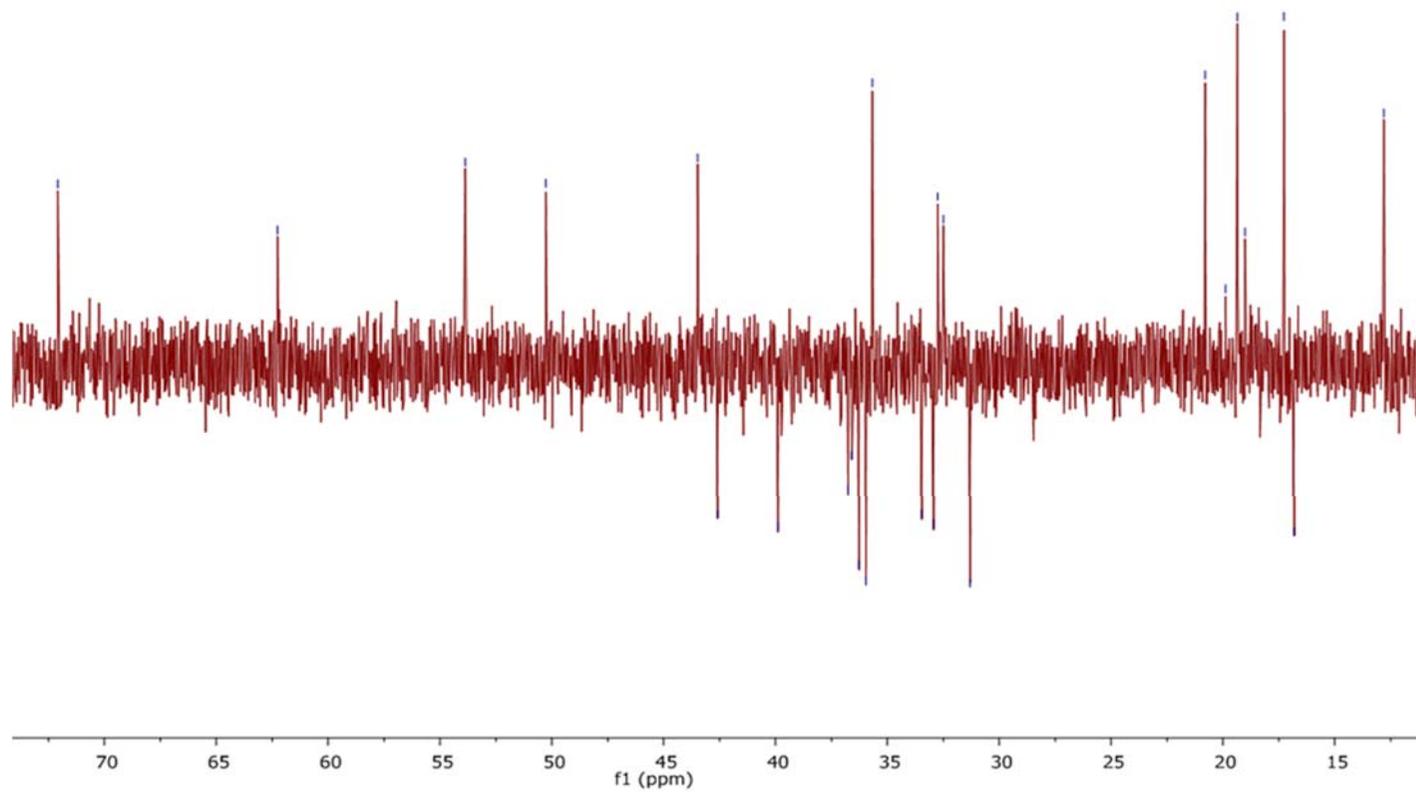
Apêndice 11. Espectro de RMN de ^{13}C da substância BdR-1 (óxido de baccharis) (100 MHz, CDCl_3).



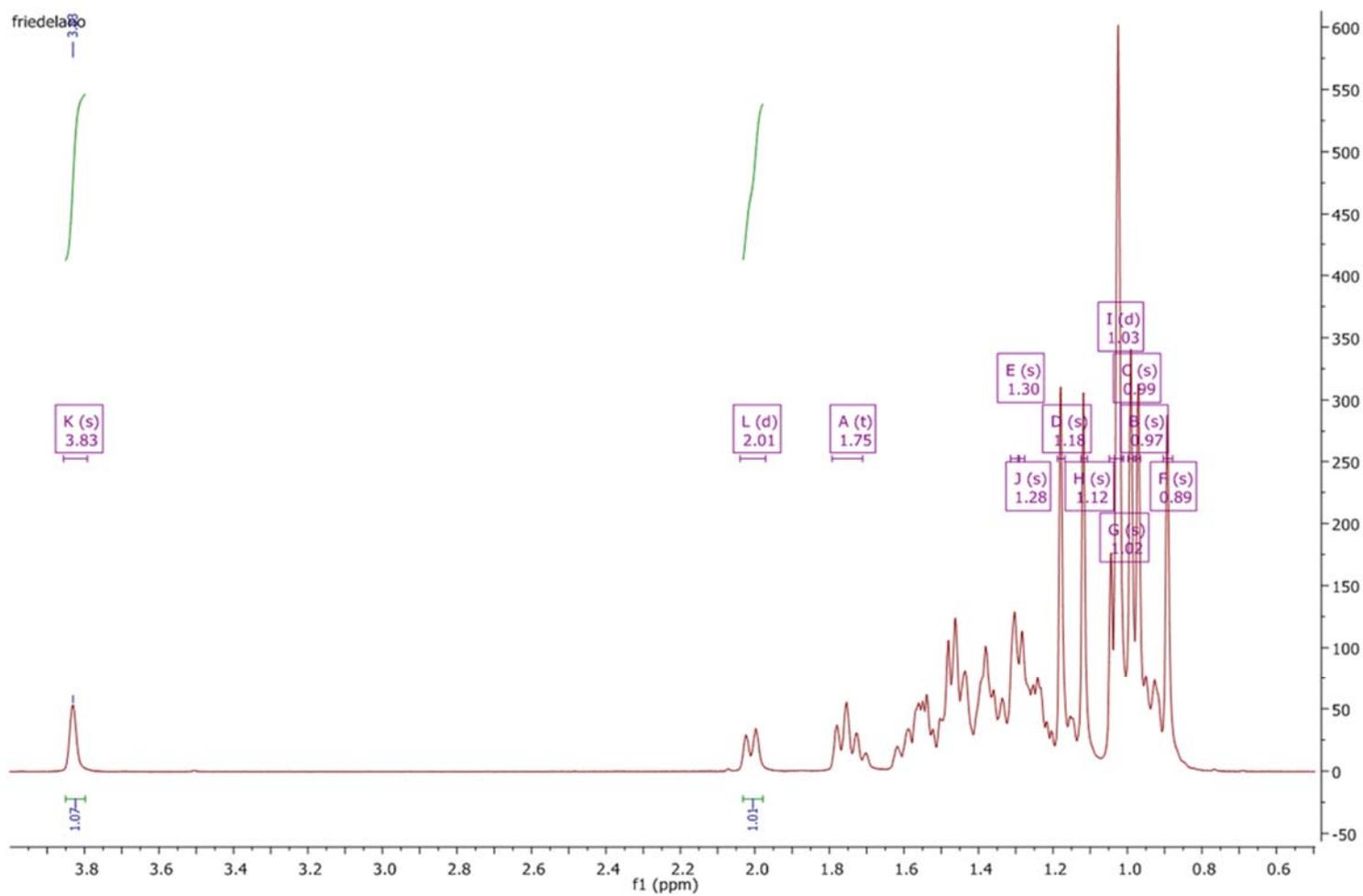
Apêndice 12. Espectro de RMN de ¹H da substância BdR-1(óxido de baccharis) (400 MHz, CDCl₃).



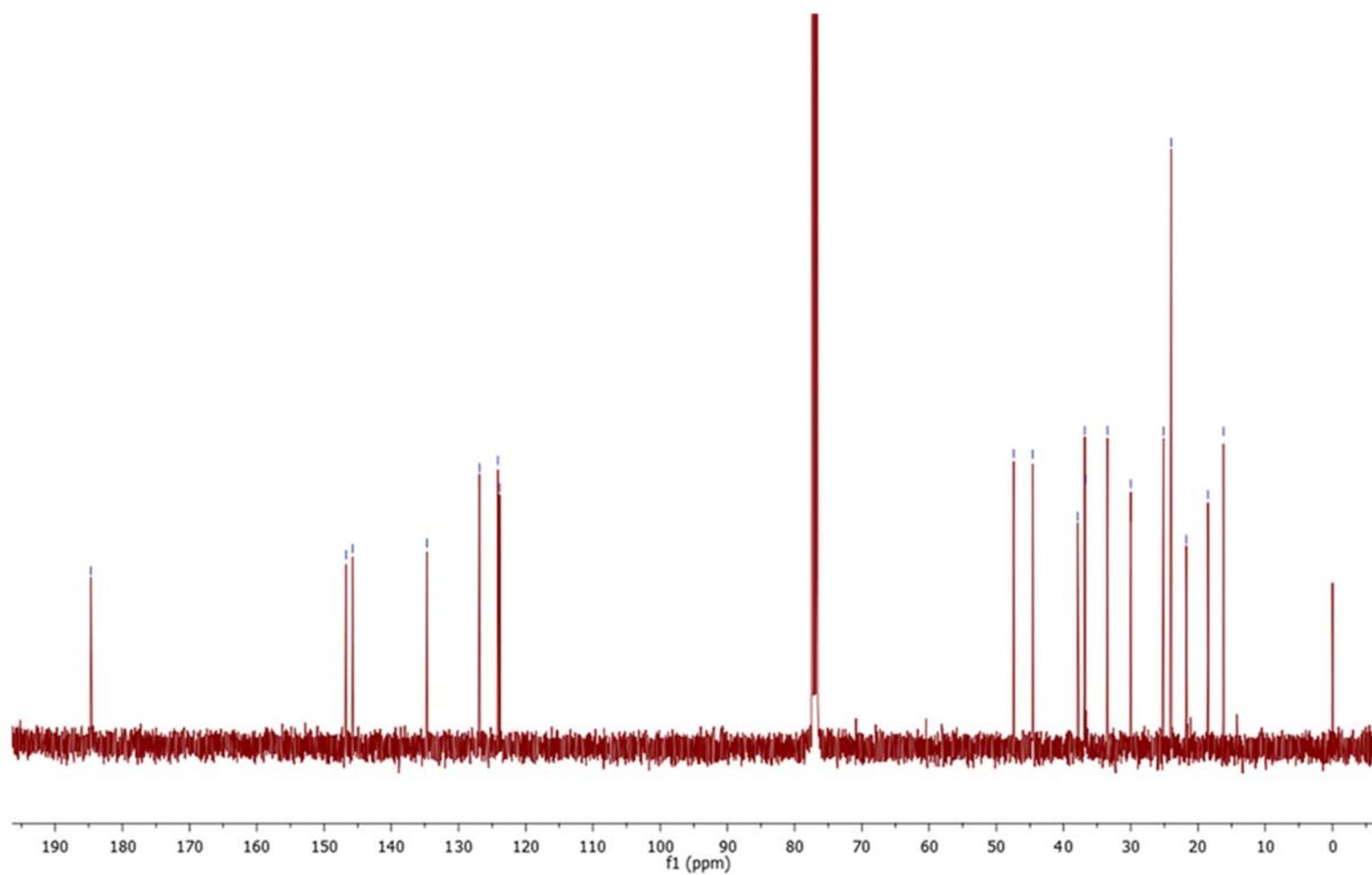
Apêndice 13. Espectro de RMN de ¹³C da substância BdR-2 (friedelanol) (125 MHz, CDCl₃; Piridina d₅).



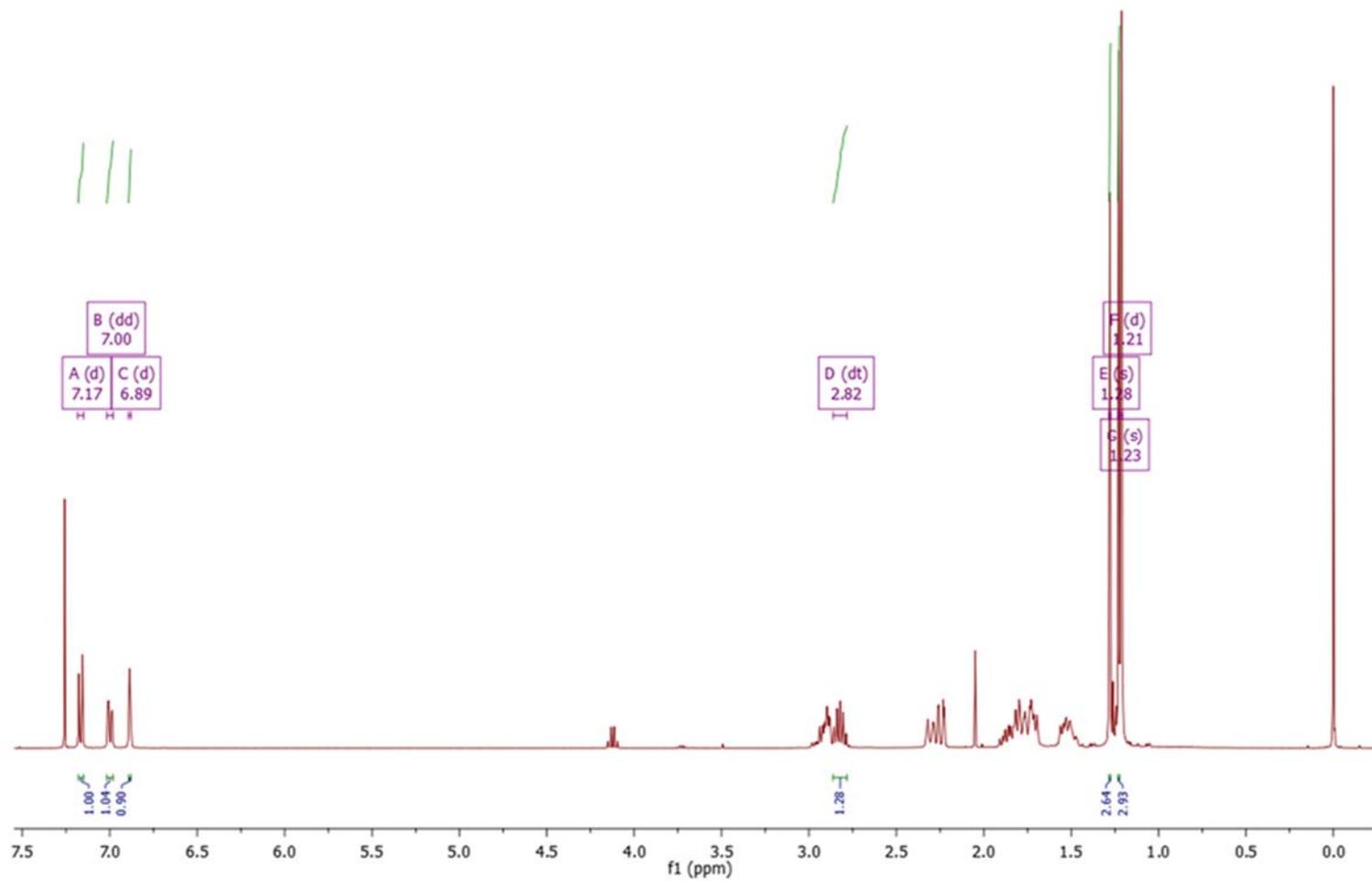
Apêndice 14. Espectro de DEPT 135 da substância Bdr-2 (friedelanol) (125 MHz, CDCl_3 ; Piridina d_5).



Apêndice 15. Espectro de RMN de ¹H da substância Bdr-2 (friedelanol) (500 MHz, CDCl₃; Piridina d₅).



Apêndice 16. Espectro de RMN de ^{13}C da substância Pe-1 (ácido deidroabiético) (100 MHz, CDCl_3).



Apêndice 17. Espectro de RMN de ^1H da substância Pe-1 (ácido deidroabiético) (400 MHz, CDCl_3).