

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS
E FRAÇÕES PURIFICADAS DA PLANTA *Arrabidaea chica*
VERL.**

MILENA RODRIGUES SOARES MOTA

Manaus/AM
2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MILENA RODRIGUES SOARES MOTA

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS
E FRAÇÕES PURIFICADAS DA PLANTA *Arrabidaea chica*
VERL.**

Tese apresentada ao programa Multi-institucional de
pós-graduação em Biotecnologia da Universidade
Federal do Amazonas, para obtenção do título de
doutora.

Orientador: Prof. Dr. Antônio José Lapa

Co-orientador: Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit

Manaus/AM
2011

MILENA RODRIGUES SOARES MOTA

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS
E FRAÇÕES PURIFICADAS DA PLANTA *Arrabidaea chica*
VERL.**

Tese apresentada para obtenção do título de
doutora pelo Programa Multi-Institucional em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio José Lapa
Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA

Dra. Ana Lúcia Basílio Carneiro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Profa. Dra. Ormezinda C. C. Fernandes
Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz
Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane

Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa
Faculdade de Medicina Veterinária
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Francisco Célio Maia Chaves
Embrapa Amazônia Ocidental

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, aos meus irmãos, ao meu marido Marcio pelo apoio e abdicação em alguns momentos e ao meu filho João Guilherme que chegou durante o desenvolvimento desse trabalho, trazendo amor e significados em minha vida – por vocês busco conhecimento e crescimento, para que possamos colher os frutos amanhã, com muita dedicação e amor - **AMO MUITO VOCÊS.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a Santa Rita de Cássia.

À Dra. Mitsue Haraguchi que além de grande amiga, foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho, no laboratório de Fitoquímica do Instituto Biológico de São Paulo.

Ao Prof. Antônio José Lapa, que com suas palavras seguras demonstradas através de suas orientações, me dava um norte e enriquecia minhas idéias a cada encontro.

À Dra. Mirtes Midori Tanae pelo apoio imenso, motivação e grande experiência com LC-MS.

À professora Helenice Spinosa, que mesmo de longe participou e auxiliou nesse trabalho.

Ao Dr. Adrian Martin Pohlit, que foi o primeiro a me receber na comunidade científica do Amazonas e nos primeiros anos me mostrou os caminhos que eu poderia percorrer.

À Dra. Ana Lúcia B. Carneiro que com seus conselhos como profissional e amiga, me ajudou a definir o delineamento dos experimentos.

À Dra. Ormezinda Fernandes, que sem duvidar de minhas palavras, me confiou seu laboratório e ambiente de trabalho. Sua supervisão foi parte fundamental para a essência dessa tese. Aqui nasceu uma grande amizade.

À Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/AM – Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane, pelo treinamento e apoio no desenvolvimento desse projeto inicial, realizado em sua sede em Manaus-AM no laboratório de Micologia.

À Josy Caldas por todo o treinamento nos estudos com os fungos e bactérias no laboratório de biodiversidade da Fiocruz-AM.

Aos médicos veterinários Luciana Maciel, Akiu Cavalcante, Roseane Cavalcante, Jaqueline e Romero; agradeço por todo o apoio na coleta das amostras de raspado cutâneo dos animais atendidos na Clínica de Pronto Atendimento Veterinário – PRONTOVET.

Ao Rodrigo Amorin que me ajudou muito no início do doutorado, com sua amizade, atenção e experiência em laboratório de química. Obrigada amigo.

Ao Prof. Vitângelo Plantamura, que sem duvidar de minha capacidade profissional, incentivou e apoiou em todos os momentos que se fizeram necessário para se chegar a conquista dessa titulação.

Ao Prof. Sérgio e Mônica Nozawa, que como amigos, sempre prontos para atender, fizeram parte da motivação desse trabalho.

À Profa. Karla Pedrosa por me conceder a liberdade de atuar na pesquisa juntamente com a função na coordenação do curso de Medicina Veterinária da Universidade NiltonLins.

À Profa. Janaina Maciel Braga pelo apoio e flexibilidade quanto minhas atividades de pesquisa e na coordenação.

Ao Luciano Borges que além de companheiro de trabalho se tornou um grande amigo, sem seu apoio não teria conquistado metade do que conquistei nos últimos 2 anos.

Aos Professores Spartaco Astolfi Filho e José Odair, como coordenadores e auxílio total para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos Luma, “Pulmão”, Renata, Ana Luiza, Leo, obrigada pelos momentos de descontração após as atividades no Instituto Biológico.

Ao Dr. Francisco Célio Maia Chaves, pelo apoio na coleta do material vegetal na Embrapa Amazônia Ocidental e auxílio na orientação e como amigo.

Aos auxiliares administrativos do Departamento de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas: Elzimar, Nubiane, Edson e Joelma.

Aos professores do corpo docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade NiltonLins – obrigada pela motivação e ajuda no dia-dia de trabalho.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA.

*“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve que
renunciar para conseguir”. **Dalai Lama***

RESUMO

Este estudo analisou o potencial terapêutico de extratos e frações purificadas da planta amazônica *Arrabidaea chica* visando seu uso tópico como medicamento e eficácia comprovada em doenças cutâneas. *A. chica* Verl., é uma *Bignoniaceae* conhecida popularmente como cajúru. O gênero *Arrabidaea* ocorre na América tropical, do sul do México ao sul do Brasil. A cor avermelhada da folha seca e sua propriedade tintorial são devidas a dois pigmentos flavonoídicos: a carajurina, que é o pigmento principal e a carajurona. Dela foram isolados saponinas e flavonóides; As 3-desoxiantocianidinas, descritas na planta parecem possuir atividade antiinflamatória. A medicina popular utiliza o decocto ou a infusão das folhas para tratar anemia, inflamações e na cicatrização da pele. Neste trabalho, a atividade antimicrobiana de extratos e frações padronizadas da *A. chica* cultivada na Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus/AM, foi avaliada contra fungos e bactérias de amostras clínicas coletadas de animais domésticos e contra amostras humanas depositadas na coleção de Microrganismos da FIOCRUZ, Manaus/AM. Para isso, as folhas secas da planta foram extraídas com solventes de polaridade crescente, as frações foram progressivamente purificadas em cromatografia de placa ou coluna de sílica-gel, os extratos semi-purificados foram padronizados em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas. Os testes de difusão em ágar, bioautografia e concentração inibitória mínima foram usados para avaliar a atividade antimicrobiana das subfrações padronizadas frente aos microrganismos *Staphylococcus epidermidis* (CBAM 293), *Staphylococcus aureus* (CBAM 324), *Pseudomonas aeruginosa* (CBAM 232), *Escherichia coli* (CBAM 002), *Trichophyton mentagrophytes* (CFAM 1288), *Microsporum canis* (CFAM 1289), *Malassezia pachydermatis* (CFAM 1290) e *Candida albicans* (CFAM 1285). As frações padronizadas foram ativas contra todos esses microrganismos, com melhores resultados contra *M. pachydermatis* e *S. epidermidis*. Os resultados foram favoráveis à utilização das subfrações padronizadas na formulação de um produto fitoterápico para uso tópico em otite canina. Nas frações ativas foram identificados os ácidos oleanólico e ursólico. Estudos posteriores deverão avaliar a possibilidade de uso humano das frações purificadas ou dos compostos identificados.

Palavras-chave: crajiru; difusão em ágar; bioautografia; concentração inibitória mínima; *Malassezia pachydermatis*; *Staphylococcus epidermidis*.

ABSTRACT

This study describes the therapeutic potential of extracts and standardized fractions of *Arrabidaea chica* leaves. *A. chica* is a Bignoniaceae popularly known as “crajiru”. The genus *Arrabidaea* occurs in Tropical America, from the Southern Mexico to the Southern Brazil. The red color of its dried leaves is attributed to two flavonoidal pigments: carajurina (main pigment) and carajurona. Chemical studies described the isolation of saponins and flavonoids from the plant leaves; purified 3-desoxyanthocyanidins were reported as anti-inflammatory. The infusion or decoction of the plant leaves is used in the folk medicine to treat anemia, inflammation and in skin wound-healing. In this work, the antimicrobial activity of the standardized extracts and fractions of *A. chica* cultivated at Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, were evaluated against fungal and bacterial microorganisms grown either from local domestic dogs and cats, or from human samples supplied by the Microorganism Collection of FIOCRUZ, in Manaus, Brazil. The plant dried leaves were extracted with increasing polarity solvents and progressively purified in preparative thin layer chromatography (TLC) and silica-gel column; the semi-purified extracts were standardized in TLC. The agar diffusion method; bioautography; minimum inhibitory concentrations tested against *Staphylococcus epidermidis* (CBAM 293), *Staphylococcus aureus* (CBAM 324), *Pseudomonas aeruginosa* (CBAM 232), *Escherichia coli* (CBAM 002), *Trichophyton mentagrophytes* (CFAM 1288), *Microsporum canis* (CFAM 1289), *Malassezia pachydermatis* (CFAM 1290) e *Candida albicans* (CFAM 1285). The standardized fractions were effective against all these microorganisms, but more intensively against *Microsporum canis* and *Staphylococcus epidermidis*. The results might favour the use of the standardized sub-fractions of *A. chica* as topic phytotherapeutic agent to treat canine external otitis. So far oleanolic and ursolic acids were identified as the main compounds in the active semi-purified fraction but other compounds of the leaves extract were not discarded. Later studies will consider the veterinarian use of the standardized extract, of the active pure entities and the convenience of the natural active antibiotic mix.

Keys-Word: crajiru; agar diffusion method; bioautography; minimum inhibitory concentrations; *Malassezia pachydermatis*; *Staphylococcus epidermidis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da espécie <i>A. chica</i> . Fonte: Smithsonian Tropical Research Institute: http://biogeodb.stri.si.edu/herbarium/species/15406/?search_key=Arrabidaea+chica	5
Figura 2. Estrutura básica das 3-antocianidinas isoladas, de acordo com ZORN et al., (2001).	7
Figur 3. Esporos e hifas de <i>Microsporum canis</i> . Fonte: http://www.medmicro.wisc.edu/resources/imagelib/mycology/images/microsporum_canis.gif	19
Figura 4. Esporo e hifas de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> . Fonte: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/imagenes%20de%20galeria/dermatofitos/images/tmentagrophytes4.jpg.jpg	20
Figura 5. Esporos de <i>Malassezia pachydermatis</i> . Fonte: http://timm.main.teikyou.ac.jp/pfdb/image/nishiyama_y_20010917/768x512/019.jpg	20
Figura 6. Espécie <i>Arrabidaea chica</i> Verlot (Bignoniaceae).	32
Figura 7. Folhas de <i>Arrabidaea chica</i> coletadas na Embrapa Amazônia Ocidental. A- Folhas separadas dos caules. B- Folhas secas após uma semana no ambiente.	33
Figura 8. Coleta do material vegetal. Separação das exsicatas e preparação para secagem em estufa de ar forçado.	34
Figura 9. Representação gráfica dos métodos de extração e fracionamentos. * Extratos e frações destinadas aos primeiros testes antimicrobianos.	36
Figura 10. Cromatografia em coluna de sílica gel. A e B- Eluição da amostra fração acetato de etila (FAE_{Ac}); e C- Eluição da amostra clorofórmio (EC_{Ac}).	40
Figura 11. Frações obtidas da coluna cromatográfica da amostra FAE_{Ac}	40
Figura 12. Esquema de fracionamento da fração FAE_{Ac} por cromatografia em coluna empacotada com sílica gel 60 e eluída com sistema CA1 (clorofórmio : acetato de etila – 4:1)	41
Figura 13. Fracionamento em coluna de vidro cromatográfica da amostra EC_{Ac}	42
Figura 14. Cromatografia em camada delgada preparativa da fração Ac9 em sílica gel 60G, fase móvel C (CAAF).	43
Figura 15. Técnica de microcultivo para identificação dos fungos isolados de raspados cutâneos de animais domésticos. A- Microcultivo de <i>Microsporum canis</i> ; e B- Microcultivo de <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	46
Figura 16. Placa representando o método de difusão em ágar pela técnica do poço	50
Figura 17. Metodologia empregada para os testes de bioautografia. A- fluxo laminar e materiais; e C- meios de cultura contendo os microorganismos e TCC sendo vertido sobre placa de cromatografia dentro de uma placa de petri.	51

Figura 18. Cromatograma das amostras de extratos clorofórmico (EC_{Ac}), padrão ácido oleanólico, fração acetato de etila (FAE_{Ac}) e extratos etanólico (EE_{Ac}), em sílica gel desenvolvida no sistema C [CAAF] e reveladas com solução de ácido sulfúrico 10% seguido de aquecimento a 100°C. Notar a semelhança das manchas indicadas pelas setas56

Figura 19. Cromatogramas dos extratos hexânico (EH_{Ac}), clorofórmico (EC_{Ac}), etanólico (EE_{Ac}) e hidroalcólico (EHA_{Ac}) em sílica gel desenvolvido no sistema C [CAAF] e revelados com reagente de Dragendorff [A], solução alcoólica de cloreto férrico [B], vapores de amônia [C], solução alcoólica de cloreto de alumínio [D], solução de ácido sulfúrico 10% seguida de aquecimento [E] e vapores de iodo [F].59

Figura 20. Acompanhamento das frações obtidas através de coluna cromatográfica da amostra EC_{Ac} aplicadas em placas de CCD de sílica gel em vidro (MERCK®), revelada com ácido sulfúrico 10% e aquecidas a 100°C. Setas: indicam as manchas que possivelmente apresentaram atividade. Frações Ac1 a Ac19 e padrão do EC_{Ac} no centro da placa62

Figura 21. Placas de CCD mostrando as manchas e fatores de retenção (R_f) das subfrações de Ac9 e Ac12, extraídas das placas preparativas de sílica gel eluídas em sistema de solvente C (CAAF). O extrato original EC_{Ac} ($CHCl_3$) foi aplicado no centro da placa. As setas indicam as manchas com R_f s de interesse (Ac9B1, $R_f=0,75$; Ac12E, $R_f=0,56$; Ac12C, $R_f=0,63$; e Ac12F1, $R_f=0,5$). As demais subfrações (Ac9C, Ac9E, Ac12B, Ac12F1, Ac9B2, Ac9C, Ac12B2, Ac12F, Ac12F2 e Ac12G) mostraram indicativos de impurezas63

Figura 22. Teste de atividade antibacteriana utilizando o método de difusão em ágar (técnica do poço). Halos de inibição confirmando a ação antibacteriana dos extratos EC_{Ac} , EE_{Ac} , FAE_{Ac} e FB_{Ac} contra as bactérias: A- *Staphylococcus epidermidis* CBAM 293; e B- *Pseudomonas aeruginosa* CBAM 232.66

Figura 23. Atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *A. chica* obtida através do método de difusão em ágar contra o fungo *Microsporum canis*. No gráfico a abcissa mostra a referência dos extratos e frações (EC_{Ac} , EE_{Ac} , FAE_{Ac} e FB_{Ac} – na concentração comum de 50 mg/mL); enquanto a ordenada mostra os valores dos halos de inibição (mm). Valores obtidos através da média e desvio padrão, usando intervalo de confiança de 95%68

Figura 24. Atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *A. chica* obtida através do método de difusão em ágar contra a bactéria *Staphylococcus aureus*. No gráfico a abcissa mostra a referência dos extratos e frações (EC_{Ac} , EE_{Ac} , FAE_{Ac} e FB_{Ac} – na concentração comum de 50 mg/mL); enquanto a ordenada mostra os valores dos halos de inibição (mm). Valores obtidos através da média e desvio padrão, usando intervalo de confiança de 95%69

Figura 25. Atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *A. chica* obtida através do método de difusão em ágar contra a bactéria *Staphylococcus epidermidis*. No gráfico a abcissa mostra a referência dos extratos e frações (EC_{Ac} , EE_{Ac} , FAE_{Ac} e FB_{Ac} – na concentração comum de 50 mg/mL); enquanto a ordenada mostra os valores dos halos de inibição (mm). Valores obtidos através da média e desvio padrão, usando intervalo de confiança de 95%69

Figura 26. Atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *A. chica* obtida através do método de difusão em ágar contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. No gráfico a abcissa mostra a referência dos extratos e frações (EC_{Ac} , EE_{Ac} , FAE_{Ac} e FB_{Ac} – na

concentração comum de 50 mg/mL); enquanto a ordenada mostra os valores dos halos de inibição (mm). Valores obtidos através da média e desvio padrão, usando intervalo de confiança de 95%70

Figura 27. Atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *A. chica* obtida através do método de difusão em ágar contra a bactéria *Escherichia coli*. No gráfico a abcissa mostra a referência dos extratos e frações (EC_{Ac} , EE_{Ac} , FAC_{Ac} e FB_{Ac} – na concentração comum de 50 mg/mL); enquanto a ordenada mostra os valores dos halos de inibição (mm). Valores obtidos através da média e desvio padrão, usando intervalo de confiança de 95%70

Figura 28. Bioautografia dos extratos (EH_{Ac} ; EC_{Ac} ; EE_{Ac} ; FAC_{Ac} ; FB_{Ac} ; EA_{Ac}) da *A. chica*. Sistema de eluição D (CA1). A- Placa controle (sem inclusão de bactérias); B – com *Staphylococcus epidermidis*, notar halos de inibição nas frações FAC_{Ac} e FB_{Ac} : $Rf=0,73$; $Rf=0,68$; e $Rf=0,62$; notar ausência de halo de inibição nos extratos EH_{Ac} , EC_{Ac} , EE_{Ac} . O controle positivo cloranfenicol (C) mostrou halo de inibição com $Rf=0,58$71

Figura 29. Bioautografia dos extratos (EH_{Ac} ; EC_{Ac} ; EE_{Ac} ; FAC_{Ac} ; FB_{Ac} ; EA_{Ac}) obtidos da planta *A. chica*. Sistema de eluição C (CAAF). A – Placa controle (sem inclusão de bactérias); B - *Pseudomonas aeruginosa*, notar halo de inibição no extrato EC_{Ac} : $Rf=0,59$; C - *Escherichia coli*, notar halo de inibição no extrato EC_{Ac} : $Rf=0,59$. Controle positivo cloranfenicol (C): $Rf=0,45$ 72

Figura 30. Bioautografia dos extratos (EH_{Ac} ; EC_{Ac} ; EE_{Ac} ; FAC_{Ac} ; FB_{Ac} ; EA_{Ac}) obtidos da planta *A. chica*. Sistema de eluição G (CM). A- Placa controle (sem inclusão de leveduras); B - *Malassezia pachydermatis*, notar halos de inibição nas frações FAC_{Ac} : $Rf=0,11$, e extratos EC_{Ac} : $Rf=0,4$; $Rf=0,5$ e $Rf=0,61$. O extrato EE_{Ac} não mostrou halos de inibição. Controle negativo itraconazol (I) com $Rf=0,89$ 73

Figura 31. Bioautografia das frações de *A. chica* obtidas através de coluna de sílica gel. A- Placa controle (sem inclusão de bactérias); B- com *Staphylococcus epidermidis*, notar halos de inibição nas subfrações de FAC_{Ac} : E4 = frações nº 61 a 66; E5 = frações nº 59 e 60; nas frações de EC_{Ac} : Ac1 = Frações nº 15 a 18; Ac3 = fração nº 2; Ac5 = frações nº 35 a 40; Ac7 = frações nº 58 a 69. FAC_{Ac} : $Rf=0,68$ e $0,82$, E4: $Rf=0,82$, E5: $Rf=0,82$, EC_{Ac} : $Rf=0,56$, $0,69$ e $0,81$, Ac1: $Rf=0,69$ e $0,82$, Ac3: $Rf=0,69$ e $0,82$, Ac5: $Rf=0,82$, Ac7: $Rf=0,82$. Controle positivo cloranfenicol (C): halo de inibição no ponto de aplicação74

Figura 32. Teste em placa para determinação da concentração inibitória mínima utilizando frações purificadas ($F12F1=Ac12F1$, $F12E=Ac12E$ e $F9B1=Ac9B1$) obtidas das folhas de *A. chica* contra *Staphylococcus epidermidis*. CN – controle negativo; CP – controle positivo. Notar que os pocinhos de coloração rósea mostram o crescimento do microrganismo (resistente as frações purificadas)77

Figura 33. Teste em placa para determinação da concentração inibitória mínima utilizando frações purificadas ($F12F1=Ac12F1$, $F12E=Ac12E$ e $F9B1=Ac9B1$) obtidas das folhas de *A. chica* contra *Pseudomonas aeruginosa*. CN – controle negativo; CP – controle positivo. Notar que os pocinhos de coloração rósea mostram o crescimento do microrganismo (resistente as frações purificadas)77

Figura 34. Teste em placa para determinação da concentração inibitória mínima utilizando frações purificadas ($F12F1=Ac12F1$, $F12E=Ac12E$ e $F9B1=Ac9B1$) obtidas das folhas de *A. chica* contra *Escherichia coli*. CN – controle negativo; CP – controle positivo. Notar que os pocinhos de coloração rósea mostram o crescimento do microrganismo (resistente as frações purificadas)78

Figura 35. Teste em placa para determinação da concentração inibitória mínima utilizando frações purificadas (F12F1=Ac12F1, F12E=Ac12E e F9B1=Ac9B1) obtidas das folhas de <i>A. chica</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> . CN – controle negativo; CP – controle positivo. Notar que os pocinhos de coloração rósea mostram o crescimento do microrganismo (resistente as frações purificadas)	78
Figura 36. Teste em placa para determinação da concentração inibitória mínima utilizando frações purificadas (F12F1=Ac12F1, F12E=Ac12E e F9B1=Ac9B1) obtidas das folhas de <i>A. chica</i> contra <i>Candida albicans</i> . CN – controle negativo; CP – controle positivo. Notar que os pocinhos de coloração rósea mostram o crescimento do microrganismo (resistente as frações purificadas)	79
Figura 37. Teste em placa para determinação da concentração inibitória mínima utilizando frações purificadas (F12F1=Ac12F1, F12E=Ac12E e F9B1=Ac9B1) obtidas das folhas de <i>A. chica</i> contra <i>Malassezia pachydermatis</i> . CN – controle negativo; CP – controle positivo. Notar que os pocinhos de coloração rósea mostram o crescimento do microrganismo (resistente as frações purificadas)	80
Figura 38. Placas utilizadas no teste para determinação da concentração bactericida mínima de frações purificadas contra <i>Malassezia pachydermatis</i> . A- Placa demonstrando concentrações com atividade bactericida; B- Placa demonstrando crescimento da levedura em amostras que demonstraram crescimento no MIC	82
Figura 39. Perfil cromatográfico da fração Ac12F1 de <i>Arrabidaea chica</i> em LC-MS utilizando coluna C18, gradiente linear de água/metanol de 15 a 95% em 30 min e fluxo de 0,2 mL/min.	83
Figura 40. Espectros de massas dos picos majoritários da fração purificada Ac12F1 da <i>A. chica</i> . A: espectro do pico com tempo de retenção de 26,2 min. B: espectro do pico com tempo de retenção de 26,7 min	84
Figura 41. Perfil cromatográfico da fração Ac9B1 de <i>Arrabidaea chica</i> em LC-MS utilizando coluna C18, gradiente linear de água/metanol de 15 a 95% em 30 min e fluxo de 0,2 mL/min	85
Figura 42. Espectros de massas dos picos majoritários da fração F1. A: espectro do pico com tempo de retenção de 1,9 min. B: espectro do pico com tempo de retenção de 27,0 min. C: espectro do pico com tempo de retenção de 27,7 min.	86
Figura 43. Perfil cromatográfico da fração Ac12E de <i>Arrabidaea chica</i> em LC-MS utilizando coluna C18, gradiente linear de água/metanol de 15 a 95% em 30 min e fluxo de 0,2 mL/min.	87
Figura 44. Espectros de massas dos picos majoritários da fração Ac12E de <i>A. chica</i> . A: espectro do pico com tempo de retenção de 2,0 min. B: espectro do pico com tempo de retenção de 13,6 min.	87
Figura 45. Estrutura química de derivados triterpênicos, (1) ácido oleanólico, (2) ácido ursólico (WOLSKA et al., 2010)	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas de solventes empregados em CCD em placas de sílica gel 60G e celulose para eluição dos extratos e frações de AC	37
Tabela 2. Constituintes dos meios de cultura sólidos para fungos filamentosos e leveduras	47
Tabela 3. Constituintes do meio de cultura sólido para bactérias.	48
Tabela 4. Rendimentos dos diferentes extratos obtidos de folhas moídas de <i>A. chica</i>	54
Tabela 5. Cromatogramas dos extratos de <i>A. chica</i> em diferentes sistemas de solventes	57
Tabela 6. Frações obtidas em coluna cromatográfica da fração acetato de etila (FAE _{Ac}), eluída em sistema de solvente CA1 (clorofórmio : acetato de etila – 4:1)	60
Tabela 7. Frações obtidas em coluna cromatográfica do (EC _{Ac}), eluída em sistema de solvente CAAF (clorofórmio : acetona : ácido fórmico – 7,5:1,6:0,8)	61
Tabela 8. Frequência dos dermatófitos, fungos de ambiente e leveduras em isolados a partir de amostras clínicas de cães e gatos com lesões características de dermatites e micoses superficiais.	64
Tabela 9. Atividade antimicrobiana dos extratos e frações de <i>A. chica</i> obtida através do método de difusão em ágar	67
Tabela 10. Concentração inibitória mínima de frações purificadas de <i>A. chica</i> contra bactérias patogênicas	76
Tabela 11. Concentração inibitória mínima de frações purificadas de <i>A. chica</i> contra leveduras patogênicas	79
Tabela 12. Concentração bactericida mínima de frações purificadas de <i>A. chica</i> contra bactérias patogênicas	81
Tabela 13. Concentração fungicida mínima de frações purificadas de <i>A. chica</i> contra leveduras patogênicas.	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Flavonóides isolados de <i>A. chica</i>	9
Quadro 2. Preparação do corante azul de lactofenol-algodão	45
Quadro 3. Resultados do teste de bioautografia com frações do extrato da planta <i>Arrabidaea chica</i>	75

LISTA DE ABREVIATURA

AC1	Variedade 1 da espécie <i>Arrabidaea chica</i> Verl.
AC2	Variedade 2 da espécie <i>Arrabidaea chica</i> Verl.
AC3	Variedade 3 da espécie <i>Arrabidaea chica</i> Verl.
Ac	<i>Arrabidaea chica</i>
CD4/CD8	Relação entre os linfócitos que apresentam os marcadores 4 e 8
CD69	Linfócitos que apresentam o marcador 69
cm	centímetros
mm	milímetro
Embrapa Amazônia Ocidental	Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias
g	Gramas
IFN- γ	Gama Interferon
kg	quilogramas
mg	miligramas
mL	mililitros
UV	Luz ultravioleta
°C	Graus Celsius
v.o.	via oral
N	Normal (concentração)
%	Por cento
®	Marca registrada
TCC	cloreto de trifeniltetrazolium (MERCK®).

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE QUADROS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. <i>Arrabidaea chica</i>	6
2.2. Atividades biológicas das planta <i>Arrabidaea chica</i>	14
2.3. Análises fitoquímicas	17
2.4. Fungos.....	19
2.4.1. Dermatofitose	20
2.4.2. Tratamentos de dermatofitose.....	23
2.5. Bactérias.....	24
2.5.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.5.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	26
2.5.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
2.5.3. <i>Escherichia coli</i>	26
2.6. Testes antimicrobianos com extratos vegetais.....	27
3. OBJETIVOS	29
3.1. Geral.....	29
3.2. Específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Equipamentos, aparelhos e outros	30
4.2. Drogas e reagentes	30
4.3. Origem do material vegetal	32
4.4. Secagem, extração e fracionamento	33

4.4.1. Processo de secagem	33
4.4.2. Processo de extração	35
4.4.3. Processo de fracionamento do EE _{Ac}	36
4.4.4. Obtenção do extrato aquoso liofilizado	36
4.4.5. Análises cromatográficas dos extratos e frações por cromatografia de camada delgada	38
4.4.6. Análises cromatográficas dos extratos e frações por cromatografia em coluna	39
4.4.7. Separação dos constituintes químicos das frações por CCD preparativa	42
4.4.8. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear de carbono	44
4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana	45
4.5.1. Microrganismos	45
4.5.1.1. Coleta e identificação dos microrganismos isolados de animais domésticos	45
4.5.2. Autenticação das culturas em nível de espécie	46
4.5.3. Reativação das culturas preservadas	48
4.5.4. Obtenção e caracterização das substâncias antimicrobianas	50
4.5.4.1. Método de difusão em Ágar pela técnica do poço	50
4.5.4.2. Bioautografia	51
4.5.4.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo	53
4.5.4.4. Determinação da concentração bactericida mínima	53
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
6. RESULTADOS	55
6.1. Rendimentos e propriedades físico-químicas dos extratos e frações purificadas	55
6.2. Atividade antimicrobiana	65
6.2.1 Atividades avaliada com o método de difusão em Ágar	66
6.2.1 Testes antimicrobianos dos extratos e frações de <i>A. chica</i> avaliadas com bioautografia	73
6.2.3 Bioautografia de frações de <i>A. chica</i> obtidos em cromatografia em coluna de sílica gel	76

6.2.4. Caracterização das substâncias antimicrobianas	79
6.3. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada e espectrometria de massas (LC-MS)	86
7. DISCUSSÃO	93
8. CONCLUSÃO	105
9. REFERÊNCIAS	106

1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade, o homem utiliza produtos provenientes da natureza para a obtenção da cura ou alívio de seus males. Dentre estes produtos, os de origem vegetal apresentam grande destaque. Hoje, temos vários exemplos de fármacos eficazes obtidos a partir da matéria vegetal: a *atropina*, alcalóide extraído da beladona (*Atropa belladonna* L.), com ação antiespasmódica e os heterosídeos cardioativos *digoxina* e *digitoxina*, oriundos da dedaleira (*Digitalis* sp. L.) utilizados no tratamento da insuficiência cardíaca (SIMÕES et al., 2004).

Na tentativa de encontrar fármacos mais eficazes, pesquisadores em todo o mundo obtêm cerca de 70 novos fármacos a cada ano, em projetos que consomem altos investimentos e até 15 anos de testes experimentais, pré-clínicos e clínicos. De acordo com a OMS, muitos efeitos farmacodinâmicos observados experimentalmente em animais e “*in vitro*” podem ser extrapolados para o homem, motivo do largo emprego dos testes toxicológicos na determinação da toxicidade e segurança dos fármacos (OMS, 2010).

O alto custo, somado aos efeitos adversos e colaterais causados por estes fármacos, juntamente com a ineficiência do atendimento médico-hospitalar público e privado, levaram a população de baixo poder aquisitivo a procurar alternativas. Uma das soluções encontradas para estes problemas foi a utilização de recursos naturais, abundantes no Brasil, especialmente na região amazônica (BANNERMAN, 1982; COSTA, 1990; FARNSWORTH, 1985).

O Brasil conta com cerca de 200 mil espécies vegetais; ou seja, quase a metade do número estimado existente no planeta. Uma grande parte destas plantas apresenta propriedades terapêuticas potencialmente úteis à população, sendo que menos de 1% dessas espécies foram estudadas adequadamente. Como no Brasil

oito em cada dez matérias-primas que integram os medicamentos industrializados são importadas, as plantas são naturalmente a fonte mais provável de futuros produtos (ROCHA, 1994; SANT'ANA, 2002).

Para um melhor estudo das plantas úteis, usa-se como ferramenta a etnofarmacologia, que consiste na combinação de informações adquiridas junto a comunidades que fazem o uso da flora medicinal, baseadas na alegação de um efeito terapêutico observado em humanos, podendo constituir um valioso atalho para a descoberta de novos fármacos (ELISABETSKY e SHANLEY, 1994).

A utilização de plantas como medicamentos é denominada de fitoterapia, sendo considerada uma alternativa para os tratamentos de patologias observadas cotidianamente. Segundo a OMS, a prática da fitoterapia pode tornar-se uma maneira eficiente para a terapêutica de várias doenças, principalmente nos países em desenvolvimento, devido apresentar baixo custo em relação à terapêutica tradicional. Cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam medicina popular alternativa e desse total, 85% usam extratos de plantas; logo, nota-se a importância do desenvolvimento de estudos na área (COSTA, 1990; OMS, 2010).

A fitoterapia, isto é, o tratamento de patologias através do uso de medicamentos cujos princípios ativos são exclusivamente de origem vegetal, sem a presença de outros componentes ativos, é normatizada no Brasil pela RDC 14/2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (ANVISA, 2010). A espécie *Arrabidaea chica* em particular, é uma planta medicinal amazônica de fácil acesso, tem cultivo controlado na Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus, dando confiabilidade à matéria prima, um pré-requisito indispensável para a produção de um bom fitoterápico (PNUD, 1994).

Levantamentos etnofarmacológicos constataram o uso da *A. chica* como antianêmico, antiinflamatório e cicatrizante. A população utiliza comumente o seu extrato aquoso em lavagens vaginais, tratamento de úlceras de pele, anemias e na cicatrização de feridas. Os índios utilizam a tintura das folhas para afecções cutâneas, diarreias, cólicas intestinais e enterocolites (OLIVEIRA et al., 1996a; BORRÁS, 2003).

As principais vias de uso do crajiru são a oral e a vaginal, através de "banho de assento" feito com o decocto. Aplicações tópicas são feitas através de compressas ou banhos. Também é relatada a utilização da planta no tratamento de disenterias (ALBUQUERQUE, 1988; MAIA et al., 1994; BALBACH, s.d.).

Além do uso medicinal, o crajiru é utilizado no interior do Amazonas como corante e tintura para algodão, tendo sido exportado em pequena escala no início do século, como corante "vermelho americano", proveniente da fermentação das folhas, seguida de ebulição. É conhecido que as folhas submetidas à fermentação e manipuladas, fornecem matéria prima, também conhecida pelo nome de corante vermelho-escuro ou vermelho-tijolo, isômero do ácido anísico, insolúvel na água e solúvel no álcool e no óleo, usadas desde tempos imemoriais pelos índios para pintura de corpo e de utensílios (MELL, 1922; TERAN, 1994).

O incremento do uso de plantas medicinais "*in natura*" ou industrializadas, aumentou também a procura de novas espécies com atividades comprovadas e baixa toxicidade, de interesse no mercado produtor e consumidor. A procura de medicamentos antimicrobianos não fugiu à regra.

De fato, o uso indiscriminado de antimicrobianos disseminou cepas de microrganismos resistentes à ação de diversos fármacos (TAVARES, 2000). Em consequência, medidas preventivas e programas de educação a clínicos,

farmacêuticos, veterinários, indústrias farmacêuticas e ao público em geral, foram instituídos para conscientizar o impacto da resistência microbiana às drogas e a consequência grave desse fenômeno na saúde pública (BERGERON e OUELLETTE, 1998).

Estudos sobre a resistência microbiana relatam antibióticos utilizados na alimentação animal e a exposição humana direta a animais portadores de cepas resistentes, sendo os cães e os gatos fontes de disseminação pelo contato direto e estreito com seres humanos (GUARDABASSI et al., 2004). Apesar de não se definir claramente em qual extensão o uso de antimicrobianos em animais contribui para o problema de resistência na medicina humana, já existem evidências de que estas cepas podem circular do animal para o ser humano e para o ambiente (CIZMAN, 2003). Estes organismos podem colonizar o homem e transferir seus genes de resistência a outros organismos da microbiota normal.

Extratos de plantas têm grande potencial antimicrobiano já identificado por diversos estudos. Na Amazônia, o *crajiro* têm sido utilizado em cosméticos e formulações farmacêuticas, como antisséptico em sabonete íntimo para mulheres, em produtos para maquiagem, cuidados com a pele, como cicatrizante de feridas cutâneas e como antiinflamatório.

Partindo da informação popular e contando com o controle das características botânicas e fitoquímicas da planta aclimatada na Amazônia Ocidental, este estudo objetivou analisar a ação antimicrobiana de extratos padronizados e frações de *A. chica*, visando a sua utilização como medicamento em tratamentos de afecções dermatológicas humanas e de animais domésticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Arrabidaea chica*

A. chica pertence a família *Bignoniaceae* composta por cerca de 120 gêneros e 650 espécies que estão distribuídas na América tropical, do sul do México ao Brasil central (CORRÊA, 1984; CRONQUIST, 1988; GRENAND et al., 1987; HEGNAUER, 1988). A *A. chica* é conhecida popularmente como crajiru, carajuru, cipó cruz, calajouru, parirí (Brasil), puca-panga (exterior), cajuru, carajiru, carajunu, crajuru, chica, china, cipó-pau, coá-piranga, cuica, guajuru, guajuru-piranga, guarajuru, oajuru, oajuru-piranga, piranga e paripari (PLANTAMED, 2011).

O gênero *Arrabidaea* ocorre na América tropical, do sul do México ao sul Brasil (Figura 1) (CORRÊA, 1984; CRONQUIST, 1988; GRENAND et al., 1987; HEGNAUER, 1988). Na Amazônia é conhecida como crajirú, carajuru, cipó cruz, calajouru, pariri (Brasil) e puca-panga (nos países vizinhos).



Figura 1. Distribuição da espécie *A. chica*. Fonte: Smithsonian Tropical Research Institute: http://biogeodb.stri.si.edu/herbarium/species/15406/?search_key=Arrabidaea+chica

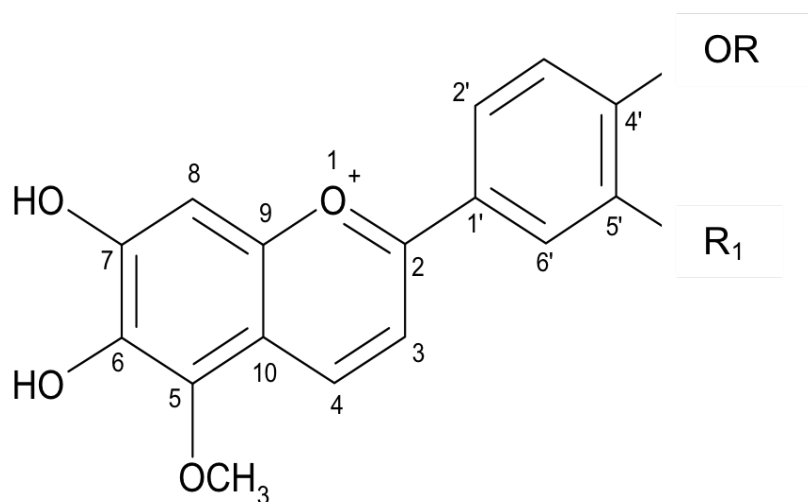
O estudo dos componentes químicos da *A. chica* a partir das folhas secas mostrou a presença de saponinas e flavonóides, sendo que a propriedade tintorial é devida a dois pigmentos flavonoídicos: a carajurina, que é o pigmento principal e a carajurona (OLIVEIRA et al., 1996b). Estudos revelaram a presença de 3-desoxiantocianidinas, sendo que um dos extratos contendo estes componentes da planta apresentou atividade antiinflamatória (ZORN et al., 2001).

A coloração vermelha adquirida pelas folhas após a coleta se deve à formação de 3-desoxiantocianidinas, caracterizada pela ausência de grupo hidroxila na posição C-3 de antocianidinas, que em bignoniáceas foram encontradas apenas em *A. chica* (SCOGIN, 1980) e raramente em outras plantas. As antocianidinas são as agliconas que formam as estruturas básicas das antocianinas. As antocianidinas consistem de um anel aromático ligado ao anel heterocíclico que contém oxigênio ligado carbono-carbono a um terceiro anel aromático ($C_6-C_3-C_6$), sendo um tipo característico do grupo de flavonóide em forma catiônica. Devido a sua forma iônica produzem pigmentos de coloração de tons avermelhado e azulado que aparecem em muitas flores e frutas e algumas raízes das plantas. As antocianinas naturais (Figura 2) como pigmentos inócuos tem potencial emprego na indústria alimentícia, todavia, elas são instáveis conforme o pH, solventes, temperatura, luminosidade e outros fatores. As mesmas propriedades físico-químicas podem afetar as antocianidinas. Todavia, as 3-desoxiantocianidinas, devido a sua estrutura química, apresentam maior estabilidade (WILLIAMS e GRAYER, 2004).

Nas folhas de *A. chica* foram ainda identificadas as flavonas acacetina (ZORN et al., 2001), tevetiaflavona (TAKEMURA, 1993), luteolina e carajuflavona (TAKEMURA et al., 1995), além das 3-desoxiantocianidinas carajurona, carajurina,

6,7,3',4'-tetraidroxi-5-metoxiflavílio e 6,7,3'-triidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio e ácido oleanólico (ZORN et al., 2001; DEVIA et al., 2002).

As 3-desoxiantocianidinas são frequentemente encontradas em folhas e pétalas nas Gesneriaceae, briófitas, pteridófitas e Poaceae. Em Bignoniaceae, elas têm sido encontradas somente em *A. chica* (SCOGIN, 1980). Foram isoladas duas 3-desoxiantocianidinas, cinco flavonas, uma flavona glicosídica conhecida como vicenina-2 (BARBOSA et al., 2008) e um triterpeno conhecido como ácido oleanólico (ZORN et al., 2001) (Quadro 1). Nas flores, foram detectadas duas antocianinas (SCOGIN, 1980).



Componente 1: R = CH₃, R₁ = H (carajurin)

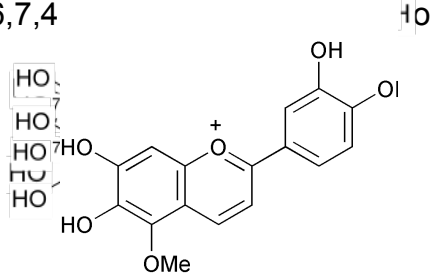
Componente 2: R, R₁ = H (carajurone)

Componente 3: R = H, R₁ = OH

Componente 4: R = CH₃, R₁ = OH

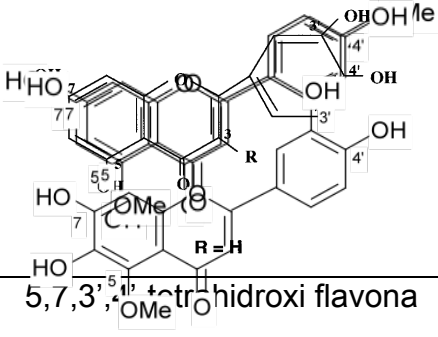
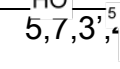
Figura 2. Estrutura básica das 3-antocianidinas, de acordo com ZORN et al., (2001).

Quadro 1. Flavonóides isolados de *Arrabidaea chica*.

	Nome comum	Estrutura molecular	Referência
1	Carajurona (pigmento 2)	6,7,4  1 R = Me	Zorn et al., 2001; Devia et al., 2002
2	Carajurina	6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxi flavílio	Chapman et al., 1927; Zorn et al., 2001; Devia et al., 2002
3	Pigmento 1 R=H	6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi flavílio	Zorn et al., 2001; Devia et al., 2002
4		6,7,3'-trihidroxi-5,4'-dimetoxi flavílio	Zorn et al., 2001; Devia et al., 2002

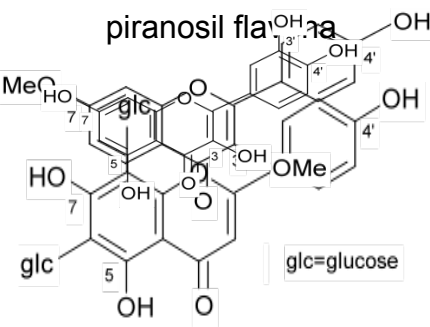
(continuação)

Quadro 1. Flavonóides isolados de *Arrabidaea chica* (continuação).

5	Acacetina	5,7-dimetoxi-4'- metoxi flavona 	Zorn et al., 2001
6	Luteolina	5,7,3',4'-tetrahidroxi flavona 	Takemura et al., 1995
7	Tevetia flavona	7,4'-dihidroxi-5-metoxi flavona	Takemura, 1993
8	Carajuflavona	6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi flavona	Takemura et al., 1995

(continuação)

Quadro 1. Flavonóides isolados de *Arrabidaea chica* (continuação).

9	Vicenina-2	5,7,4'-trihidroxi-6,8-diglucopiranosil flavona 	Barbosa et al., 2008
10		4'-hidroxi-3,7-dimetoxi flavona	Barbosa et al., 2008
11	Campferol $R=OH$, $R^1=R^2=H$	3,5,7,4'-tetrahidroxi flavona	Barbosa et al., 2008

A planta foi classificada taxonomicamente segundo CRONQUIST, 1988, da forma a seguir:

Divisão: Magnoliophyta
 Classe: Magnoliopsida
 Subclasse: Asteridae
 Ordem: Scrophulariales
 Família: Bignoniaceae
 Gênero: *Arrabidaea*
 Espécie: *Arrabidaea chica*

Apresenta sinónímias botânicas registradas de *Adenocalymma portoricensis* A. Stahl, *Arrabidaea acutifolia* A. DC., *Arrabidaea cuprea* (Cham.) Bornm., *Arrabidaea larensis* Pittier, *Arrabidaea rosea* DC., *Bignonia chica* Humb. & Bonpl., *Bignonia cuprea* Cham., *Bignonia erubescens* S. Moore, *Bignonia triphylla* Willd. Ex DC., *Lundia chica* (Humb. & Bonpl.) Seem., *Temnocydia carajura* Mart. Ex DC., *Vasconcellia acutifolia* C. Mart. Ex DC. (PLANTAMED, 2011).

Segundo CORRÊA (1984), caracteriza-se por ser uma trepadeira de ramos cilíndricos e glabros enquanto jovens, depois tetrágonos, lenticelado-verrucosos e estriados. Apresenta folhas pecioladas, compostas de dois ou três folíolos com um cirro intermédio simples e terminal; os folíolos são peciolulados, podendo ser oblongos, oblongo-lanceolados ou oval-lanceolados, raramente ovais e quase sempre curto-agudo-acuminados, obtusos na base, glabros nas duas páginas, coriáceos, reticulado-venosos, discolores ou concolores. O cálice é densamente pulverulento com flores campanulado-infundibiliformes, róseas ou violáceas ou purpúreo-brancacentas com face branca, aveludadas, dispostas em panícula terminal piramidal, frouxa, de até 22 cm de comprimento. Possui fruto capsular linear, alongado, agudo dos dois lados e com uma nervura média saliente nas valvas, glabro, castanho-ferrugineo, sementes ovóides.

Segundo informações da Embrapa Amazônia Ocidental, a espécie não floresce na região Amazônica, sendo multiplicada por estacas (CORRÊA, 1984).

A espécie apresenta 3 tipos:

AC-1 acutifolia, que na literatura é descrita com as seguintes sinónímias: *A. acutifolia* DC., *A. rosea* DC., *Temnocydia carajuru* M., *Vasconcellia acutifolia* M. de folhas maiores (até 15 cm de comprimento), com corola menor (até 2 cm);

AC-2 *angustifolia*, de porte menor, folhas lanceoladas e menores (até 5 cm de comprimento);

AC-3 *cuprea* (*Bignonia cuprea* Cham.), de folhas menores, estreitas, curto-obtuso-acuminadas, com reticulado cor de cobre (*B. chica* HBK., *B. thyrsoidea* DC.), de folhas maiores, agudíssimas (até 10 cm de comprimento e 6 cm de largura), panícula maior e corola de 3 cm (CORRÊA, 1984).

A análise morfo-anatômica das lâminas contendo cortes em seção transversal, mostrou existir um padrão morfológico diversificado para as folhas dos três tipos de *A. chica*. Estas diferenças morfológicas podem contribuir para uma análise taxonômica mais precisa de *A. chica* e demonstram que um exame microscópico dos cortes transversais de suas folhas contribui para a sua identificação (COSTA et al., 2001).

A escolha do tipo AC-1 deve-se ao fato deste apresentar cromatograficamente os mesmos componentes fitoquímicos quando comparado ao tipo AC-2. A variedade AC-3, difere tanto na estrutura vegetal como na química em relação às demais. O tipo AC-1 é o de melhor rendimento em relação aos componentes químicos, além de apresentar crescimento mais rápido e ser mais resistente às pragas (ALVES e ALMEIDA, 2001). Estas diferenças justificam, e quase obrigam a padronização dos extratos de *A. chica* a serem avaliados farmacologicamente.

2.2.1 Atividades biológicas da planta *Arrabidaea chica*

Testes farmacológicos pré-clínicos em ratos Wistar mostraram uma diminuição no tempo de cicatrização de feridas abertas e suturadas com a utilização de *A. chica* na forma de loção. O extrato aquoso por via oral também apresentou

ação antiinflamatória, tanto em edema de pata como no teste de pleurisia em camundongos (ANDRADE et al., 1997; MAIA, et al., 1994, OLIVEIRA et al., 1996b).

As possíveis atividades antiedematogênica e analgésica da *A. chica* no modelo de dor inflamatória, foi confirmada de acordo com as informações populares do uso da planta (ANDRADE et al., 1997; SAMPAIO et al., 1998) e possível atividade cicatrizante de uma loção à base de *A. chica* (OLIVEIRA et al., 1998).

O extrato aquoso de folhas secas desta espécie apresentou atividade imunofarmacológica, *in vitro*, testada no modelo de pleurisia induzida por zimosan e na ativação *in vivo* de linfócitos em camundongos. O extrato foi capaz de inibir a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados *in vitro*. Da mesma forma, foi eficaz a liberação de IFN- γ (81,34 %) por esplenócitos estimulados *in vitro* com Concanavalina. A administração *in vitro* do extrato causou um aumento da expressão do CD69, marcador de ativação celular, porém não alterou a proporção de linfócitos CD4/CD8. Estes resultados confirmam a atividade antiinflamatória, descrita no uso popular, e sugerem uma atividade imunorreguladora para esta espécie de *A. chica* (SAMPALIO et al., 1998).

Testes com o extrato aquoso da *A. chica* não demonstraram atividade anti-ulcerogênica em ratos com úlcera gástrica experimental (CUNHA et al., 2000). Testes em portadores de queimaduras e escoriações, sugerem ação anti-inflamatória e cicatrizante no tratamento de queimaduras (MENDES et al., 2002) e em processos alérgicos (MELLO et al., 2002). A formulação de um gel incorporado com *Arrabidaea chica* foi testada em feridas provocadas na pele de ratos e demonstrou que o produto possui ação farmacológica (PAES et al., 2005). Experimentos realizados em edema induzido em ratos por venenos de serpentes

amazônicas demonstraram ação antiinflamatória utilizando-se o extrato aquoso da *A. chica* (OLIVEIRA et al., 2006).

Os testes de toxicidade pré-clínica em ratos Wistar e camundongos Swiss, utilizando o extrato aquoso de *Arrabidaea chica*, realizados no laboratório de Farmacodinâmica da Universidade do Amazonas, indicaram que a DL₅₀ em camundongos, ultrapassa 2 g/kg ip. e 6 g/kg v.o., não ocorrendo nenhuma morte durante a pesquisa. Testes de toxicidade subaguda com doses repetidas, em ratos, indicaram que a infusão foi bem tolerada pelos animais, que não apresentaram nenhum sinal ou sintoma anormal, ou alterações histopatológicas nos órgãos examinados ao fim de 120 dias de uso contínuo (ENRICONI e BORRÁS, 1996; MAIA et al., 1994; CHU e BORRÁS, 1997; OLIVEIRA et al., 1995).

O extrato aquoso de *Arrabidaea chica* não apresentou toxicidade após administração por via oral em ratos (OLIVEIRA et al., 1996a). Já experimentos realizados com o extrato aquoso de *A. chica*, administrado de forma repetida, aumentou todos os parâmetros hematológicos, com um pico em 60 dias, o que está de acordo com a informação popular de ação antianêmica (OLIVEIRA et al., 1996b), porém os elementos Fe, Mn, Zn e Cu, presentes nas folhas de *Arrabidaea chica* apresentaram quantidades inferiores às necessárias para sugerir uma atividade terapêutica como antianêmico (SOARES et al., 2003).

Estudos determinaram as concentrações de conteúdos fenólicos e flavonoídicos nas folhas de *A.chica* como sendo de 10,2 mg/g e 0,06 mg/g, respectivamente. Nos extratos aquosos em forma de infusão e decocção, e em tinturas alcoólicas a 30%, 50% e 70% desta planta, as concentrações dos flavonóides totais foram, respectivamente, de 1,30%, 1,84%, 4,87%, 10,49% e 14,70% (SOARES, et al., 2003).

Em condições experimentais, o extrato aquoso de *A. chica* obtido a partir da técnica de infusão na concentração de 70 mg/kg peso, não mostrou atividade ulcerogênica, pois não provocou nenhuma alteração histopatológica na mucosa do estômago de ratos Wistar testados, e que também não apresentou atividade protetora da formação de úlceras por etanol (CUNHA et al., 2000).

Atividades antifúngica e antibacteriana foram descritas através dos testes de concentração inibitória mínima, concentração fungicida mínima e difusão em disco dos extratos etanólico bruto e derivados não padronizados obtidos da planta *Arrabidaea chica* contra as leveduras *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, contra fungos filamentosos *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*, contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus hominis* (BARATA et al., 2006).

2.3 Análises fitoquímicas

Em análises fitoquímicas, quando não se conhece previamente o conteúdo do material a ser analisado, costuma-se submeter o material a sucessivas extrações, com solventes de polaridade crescente, conseguindo-se, assim, uma extração fracionada, em que as diferentes frações contêm compostos de polaridade também crescente (FALKENBERG et al., 2003).

A cromatografia é um método frequentemente utilizado para a separação de misturas de substâncias presentes no extrato, para a identificação ou determinação da pureza (WATERMAN e MOLE, 1994). A cromatografia é o processo de análise imediata por migração diferencial dos componentes de uma mistura, dentro do sistema cromatográfico. Este sistema é o conjunto formado pela mistura a ser analisada, pela fase fixa ou estacionária (representada por um sólido poroso) e a

fase móvel, representada pelo solvente ou eluente, que fluindo através da fase fixa irá deslocar os solutos (MATOS, 1997).

As técnicas cromatográficas mais utilizadas para extratos vegetais e de fungos são a cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia líquida em coluna aberta (CC), a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo importante o acoplamento de métodos de detecção adequados a estas técnicas visando a determinação do teor dos constituintes ativos ou principais (HOSTETTMANN et al., 1997).

A pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença. Para se determinar os constituintes ou as substâncias responsáveis por uma certa atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural das mesmas (FALKENBERG et al., 2003).

A identificação de metabólitos secundários pode servir para obtenção de novas drogas e conduzir ao desenvolvimento de novas substâncias terapêuticas (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). O metabolismo das plantas é composto por um conjunto de reações químicas que ocorre continuamente nas células (MORAIS e BRAZ-FILHO, 2007). A síntese de compostos como aminoácidos, açúcares, ácidos graxos e nucleotídeos, essenciais para a sobrevivência dos vegetais, faz parte do metabolismo primário. Muitas substâncias produzidas pelo metabolismo secundário possuem propriedades biológicas importantes e estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação da planta ao seu meio. As substâncias pertencentes a essa classe de metabólitos possuem diversas funções biológicas, tais como defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra raios UV,

atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (FUMAGALI et al., 2008).

Dentre os metabólitos secundários, vários compostos têm mostrado ação antifúngica, tais como os alcalóides esteroidais cuja atividade está relacionada com a capacidade de desestabilizar membranas biológicas (CASTILHOS et al., 2007). Como exemplo, pode-se citar a tomatina isolada do tomate (*Lycopersicum esculentum* L.), que possui um amplo espectro antimicrobiano, sendo ativa contra *Aspergillus* spp., *Candida albicans* e *Trichophyton* spp., fungos saprófagos, algumas bactérias Gram-positivas e protozoários. Os glicoalcalóides presentes na batata (*Solanum tuberosum* L.), a solanina e a chaconina, também são ativos contra alguns fungos fitopatógenos, tais como *Trichoderma virile*, *Helminthosporium carbonum*, *Fusarium caeruleum* e *Cladosporium fulvum* (SIMÕES et al., 2004).

Outras classes de compostos, tais como as quinonas, têm apresentado atividade antifúngica. O timol (2-isopropil-5-metil fenol) e seu isômero de posição, carvacrol (5-isopropil- 2-metil fenol) possuem ação antibacteriana e antifúngica maiores que o fenol, e ao mesmo tempo, menor toxicidade que esse composto. Os taninos, presentes na pitangueira, por exemplo, possuem ação bactericida e fungicida. Os glicosinatos presentes na mostarda também possuem efeito antimicótico em casos de dermatofitoses produzidas em cobaias (SIMÕES et al., 2004).

2.4 Fungos

Os fungos são microrganismos que constituem um grupo diversificado e abundante na natureza, fazendo parte de vários nichos no ambiente, incluindo a microbiota de homens e animais. São caracterizados por estruturas unicelulares ou

multicelulares e classificados de acordo com sua morfologia em filamentosos, leveduras e dimórficos (PRADO, 2007). São seres eucarióticos, isto é, apresentam uma membrana nuclear que envolve os cromossomos e o nucléolo. São classificados como seres heterotróficos por não possuírem pigmentos fotossintéticos (SIDRIM e ROCHA, 2004).

O reino *Fungi* (*Eumycota*) está atualmente subdividido em sete filos: *Microsporidia*, *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Glomeromycota*, *Basidiomycota* e *Ascomycota*, sendo estes dois últimos incluídos no sub-reino *Dikarya* (HIBBETT et al., 2007).

Os fungos causam doenças em animais e vegetais, destroem a madeira e materiais sintéticos e compartilham com as bactérias um importante papel na decomposição de restos orgânicos do solo (MENDES-GIANINNI e MELHEM, 1996).

As afecções cutâneas por fungos são as patologias mais frequentes em animais domésticos. Muitas dermatoses, não-específicas, pruriginosas ou não, são diagnosticadas como micoses com base em evidências clínicas inadequadas. As infecções oportunistas causadas pelos fungos dermatófitos – comumente encontrados em animais domésticos (*Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*) e leveduras (*Malassezia pachydermatis* e *Candida albicans*) estão entre as infecções fúngicas mais difundidas na clínica de animais domésticos (QUINN et al., 2005).

2.4.1 Dermatofitose

A dermatofitose é uma infecção de estruturas queratinizadas como unhas, pêlos e camada córnea da pele, de fácil contágio. Em cães, os fungos dermatófitos

zoofílicos (preferem animais como hospedeiros), mais comuns são o *Microsporum canis* (Figura 3) e o *Trichophyton mentagrophytes* (Figura 4), já os dermatófitos geofísicos (encontrados no solo) como o *Microsporum gypseum* são menos frequentes. As leveduras são encontradas em problemas de pele, porém, menos prevalentes como a *Malassezia pachydermatis* (Figura 5) e a *Candida albicans* (BIBERSTEIN, 2003).



Figura 3. Esporos e hifas de *Microsporum canis*. Fonte: http://www.medmicro.wisc.edu/resources/imagelib/mycology/images/microsporum_canis.gif.



Figura 4. Esporos e hifas de *Trichophyton mentagrophytes*. Fonte: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/imagenes%20de%20galeria/dermatofitos/images/tmentagrophytes4.jpg.jpg>.

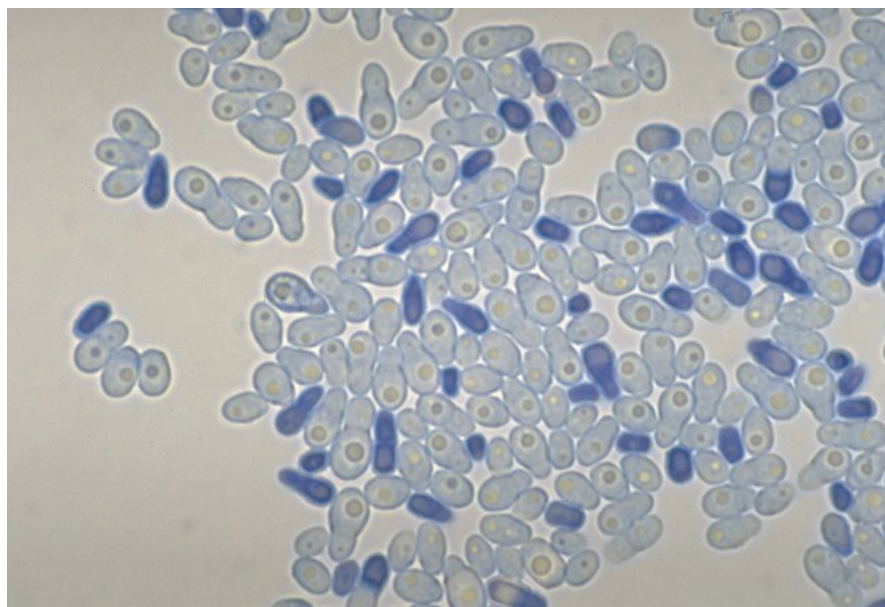


Figura 5. Esporos de *Malassezia pachydermatis*. Fonte: http://timm.main.teikyou.ac.jp/pfdb/image/nishiyama_y_20010917/768x512/019.jpg.

As micoses superficiais em humanos podem ser originadas da própria microbiota normal como a *Malassezia furfur*. A *Malassezia* sp. é uma levedura zoofílica e lipofílica, porém não lipodependente, encontrada na superfície cutânea e conduto auditivo externo de mamíferos, sendo, ocasionalmente, isolada da pele sadia do homem. As leveduras do gênero *Malassezia* sp., pertencem à família *Cryptooocaceae*, ordem *Cryptococcales*, classe de *Blastomycetes*, divisão *Deuteromycotina*. São leveduras com espessa membrana celular, com múltiplas camadas (NOBRE et al., 2001). *M. pachydermatis* é a única espécie lipofílica não dependente do gênero entre as outras sete espécies existentes (ZAITZ et al., 2000). A *Candida albicans* pertence a microflora da pele e mucosas e pode ocasionar doenças de pele de maneira oportunista (WECKESSER et al., 2007). Geralmente são microrganismos comensais e que habitam a pele de mamíferos e aves, inclusive o canal auditivo do cão.

O contato direto com ectoparasitas (artrópodes) e hifas de fungos é o principal modo de transmissão. Estes organismos podem estar presentes nos animais ou no ambiente, mas também em escovas, pentes e camas do animal ocorrendo o contágio (WILLEMSE, 1994).

A prevalência dos fungos é indiferenciada por diversos fatores tais como região, clima e população animal. Alguns fungos oportunistas podem produzir dermatomicoses devido a stress, terapêutica com esteróides ou antibióticos. O sucesso do isolamento de fungos saprófitas depende de diversas considerações, tais como, sinais clínicos, quantidade de colônias isoladas em cultura e isolamento repetido do mesmo fungo (MAZA, 1999).

Quanto aos aspectos clínicos, a lesão pode ser localizada, multifocal ou generalizada. Pode haver prurido mínimo a discreto e, ocasionalmente, intenso. Em

geral, as lesões se manifestam como áreas circulares de alopecia, irregular ou difusa, com graus variados de descamação. Os pêlos remanescentes, podem parecer curtos ou quebradiços. Outros sinais incluem eritema, pápulas, crostas, seborréia e oncodistrofia de uma ou mais falanges (BIBERSTEIN, 2003).

Quando o animal apresentar os sinais clínicos de dermatofitose devem ser realizados exames complementares de pele que possibilitem o diagnóstico diferencial de outras dermatopatias como demodicose, piodermatite superficial, processos alérgicos ou neoplásicos (WILLEMSE, 1994).

2.4.2 Tratamentos de dermatofitose

Para o tratamento de dermatofitoses, os agentes antifúngicos sistêmicos são os fármacos de escolha, pois os cães apresentam alta densidade de pêlos e os organismos estão profundamente inseridos nos folículos pilosos, então o contato com agentes tópicos não se faz completo. O tratamento antifúngico sistêmico não reduz o contágio rapidamente e tem-se um acréscimo de eficácia quando associado aos agentes tópicos (MULLER et al., 1985).

O cetoconazol é indicado para uso sistêmico em dosagem de 5-10 mg/kg, sendo que pode ser utilizado para tratamento tópico. Possui amplo potencial terapêutico para o tratamento de infecções micóticas superficiais e sistêmicas. O itraconazol é um antifúngico de largo espectro com indicação para micoses superficiais e quando o cetoconazol não se demonstrou eficiente, com dose diária de 5-10 mg/kg e em micoses profundas e subcutâneas com doses de 10-20 mg/kg/dia. Agentes antimicóticos mais comumente encontrados em cremes e pomadas incluem clotrimazol (1%, 2x/dia), muito aplicado em infecções por *Microsporum canis* e *Trichophyton mentagrophytes*, econazol e miconazol (1-3%), tendo seu uso tópico

mais indicado devido à toxicidade que apresentam. Enilconazol possui indicação somente veterinária com mínimos efeitos colaterais, tem sido eficaz no tratamento de dermatofitoses em concentração final de 0,2%. O tratamento de dermatofitoses beneficia-se muito de banhos contendo antifúngicos. Assim sendo, enilconazol 0,2% e clorexidina 2-4% demonstraram-se muito eficientes para este fim (NOBRE et al., 2002).

Em geral, o prognóstico é bom para animais com dermatofitose, sendo desfavorável em animais com doenças imunossupressoras primárias (MEDLEAU e HNILICA, 2003).

2.5 Bactérias

Existe um amplo grupo de microrganismos patogênicos associados a infecções de pele. As bactérias gram-positivas *Staphylococcus* sp e *Streptococcus* sp., ocasionam infecções do tipo furúnculos, carbúnculos, abscessos, impetigos e erisipelas. *Pseudomonas* sp. são comensais e relacionadas a doenças imunocompetentes (WECKESSER et al., 2007).

Na medicina veterinária, as causas mais comuns de tratamento com antimicrobianos em cães e gatos são: feridas e infecções da pele, dermatites, infecções no trato respiratório, urinárias, gastrintestinais e otite canina (GUARDABASSI et al., 2004). As afecções da pele mais frequentemente diagnosticadas nos animais domésticos são de origens bacterianas, imunopáticas e endócrinas, sendo que no Brasil, as parasitárias também estão entre as mais frequentes.

Nos cães, as bactérias encontradas normalmente na pele são: *Microccus* sp., *Staphylococcus* coagulase-positiva (*Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus*

epidermitis), *Staphylococcus* coagulase – negativa, *Streptococcus* hemolítico, *Clostridium* sp., e o *Propionibacterium* acnes. Já nos gatos encontramos: *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* coagulase – negativo (*Staphylococcus simulans*), *Streptococcus* alpha hemolítico e *Acinetobacter* sp. As afecções cutâneas normalmente são infecções oportunistas. Outros gêneros comuns são: *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Streptococcus* sp., esses podem complicar a infecção cutânea como invasores secundários (WILLEMSE, 1994).

2.5.1 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é frequentemente encontrado como membro da microbiota normal do corpo humano e é das bactérias patogênicas mais importantes, pois atua como agente de uma ampla gama de infecções, variando desde aquelas localizadas, geralmente superficiais, até algumas disseminadas (TRABULSI et al., 2005). Apesar da grande variedade de quadros clínicos causados pelo *S. aureus*, as infecções superficiais são muito comuns, como abscessos cutâneos e as infecções de feridas.

2.5.2 *Staphylococcus epidermidis*

O *Staphylococcus epidermidis* é frequentemente encontrado na microbiota normal ou como causa de infecções em humanos e animais. Encontrado constantemente em pele e nas mucosas, de maneira semelhante ao que ocorreu com outros membros da microbiota normal, nas últimas décadas o *S. epidermidis* tornou-se um importante agente de infecção hospitalar (BUERIS et al., 2005).

2.5.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é encontrado no solo, na água, nos vegetais, nos animais, nos alimentos e nos mais diversos ambientes hospitalares. Dificilmente a *P. aeruginosa* causa infecção em um indivíduo normal. O início da infecção ocorre devido uma deficiência na defesa do organismo. Pode ocorrer em traumas, cirurgias, queimaduras, diálises, transplantes, ou até mesmo no uso prolongado de cateter (LINCOPAN e TRABULSI, 2005).

2.5.4 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma espécie da família Enterobacteriaceae extremamente heterogênea e complexa. Encontra-se na flora intestinal do homem e também dos animais e está associada com infecções urinárias, meningites e outras infecções extra-intestinais (FRANZOLIN et al., 2005).

2.6 Testes antimicrobianos com extratos vegetais

Os métodos de triagem mais utilizados são os de difusão em ágar e o bioautográfico, que são considerados qualitativos, pois apenas mostram se existe ou não atividade antibiótica no extrato (RIOS et al., 1998). Os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados pela National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) e desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos convencionais como os antibióticos (NASCIMENTO et al., 2007).

A identificação de fungos filamentosos tem como fundamento, a observação da morfologia da colônia e aspectos microscópicos. A análise da colônia visa observar: cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura, entre outros, e pode ser feita no tubo de ensaio contendo a cultura primária do fungo. Porém, o

mais adequado é a análise do fungo em uma cultura feita no ponto central de uma camada de ágar distribuído em placa de Petri. A velocidade de crescimento, que pode ser rápida (< 7 dias), intermediária (8 a 14 dias) ou lenta (> 15 dias) é fundamental para identificação presuntiva do fungo. A diferenciação foi feita das espécies dos fungos e bactérias que causam afecções dérmicas em animais domésticos.

A técnica de microcultivo em lâmina visa proporcionar o estudo detalhado das diferentes estruturas fúngicas, bem como a disposição destas ao longo das hifas. A observação das estruturas microscópicas, tais como: hifa hialina ou demácia, septada ou cenocítica, forma, disposição e formação dos esporos, são suficientes, em geral, para a identificação de fungos filamentosos. A morfologia microscópica é melhor visualizada com a técnica de microcultivo que preserva a disposição original dos esporos sobre as hifas e mantém íntegras certas estruturas formadoras de esporos.

O método bioautográfico foi acrescentado aos protocolos tradicionais usados na pesquisa de produtos naturais com atividade antibacteriana em 1946, por Goodall e Levi. Atualmente, este método é usado por integrantes de laboratórios de química de produtos naturais, devido às facilidades de execução (ELOFF, 2001).

Os métodos de diluição *in vitro* detectam possíveis atividades antimicrobianas de compostos, utilizando métodos celulares sem alvo específico. O ensaio para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) é obtido através da microdiluição que consiste em se preparar diluições sucessivas do antimicrobiano a ser testado, em meios de cultura sólidos ou líquidos, semear a bactéria ou fungo em estudo e após incubação verificar a menor concentração (maior diluição) do antimicrobiano que inibiu o crescimento do microrganismo. Determina-se a CIM,

como sendo a menor concentração que inibe o crescimento do microrganismo. Este método apresenta a vantagem de ser quantitativo, podendo ser usado, tanto para amostras hidrossolúveis, como lipossolúveis (MITSCHER et al., 1972; RIOS et al., 1998).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente trabalho visa o estudo farmacológico antimicrobiano *in vitro* de extratos e frações purificadas da planta *Arrabidaea chica* frente a espécies de bactérias e fungos comumente associados a doenças de pele de humanos e animais domésticos.

3.2 Específicos

- ✧ Obter extratos padronizados e frações purificadas da planta;
- ✧ Testar o efeito antimicrobiana *in vitro* dos extratos e frações purificadas;
- ✧ Conhecer os constituintes químicos da planta *Arrabidaea chica*; e
- ✧ Identificar substâncias potencialmente ativas contra microrganismos patogênicos para o homem e os animais domésticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos, aparelhos e outros

- Aparelho rotoevaporador BUCHI® - Rotavapor R-210
- Autoclave vertical SC-75
- Câmara com lâmpada de UV 254 e 366nm
- Capela de fluxo laminar horizontal
- Centrífuga 5804R - Eppendorf®
- Coluna de vidro 60 cm de comprimento e 4,5 cm de largura
- Cuba Cromatográfica para CCD da marca Merck®
- Espátula de aço-inox
- Estufa de secagem e esterilização com circulação e renovação de ar Marconi®
- Estufa de incubação de temperatura controlada
- Lâmina de vidro
- Lamínula
- Liofilizador Thermo Electron Corporation – Thermo Fisher Scientific®, Modelo FR- Drying Digital Unit – Modulyod 115
- Lupa binocular microscópica 410 Ron
- Microscópio biológico binocular Nikon®
- Misturador vortex Q920
- Moedor industrial
- Papel filtro
- Pera de borracha
- Pinça anatômica

- Pipetador automático GILSON (100, 200 e 1000 μ L)
- Pipeta graduada de vidro (1, 5 e 10 mL)
- Pipeta graduada descartável (10 e 20 mL)
- Placa de aquecimento Fisatom®
- Placas de alumínio para Cromatografia em camada delgada em sílica gel
Art. 5554 –DC- Alufolien Kieselgel 60 F254 – Merck®
- Placas de alumínio para Cromatografia em camada delgada em celulose -
HPTLC – Alufolien 1.16092.0001 - Merck®
- Placas com 96 poços
- Placas de plástico para Cromatografia em camada delgada em sílica gel –
1.05735.25 – TLC Plastic sílica gel 60 F254 - Merck®
- Placas de vidro 20x20 cm, 5 mm de espessura
- Placas de vidro para Cromatografia em camada delgada em sílica gel -
1.05642-50 HPTLC – Platten Kiesilgel – F254 - Merck®
- Placas de Petri
- Proveta graduada (1000 mL)
- Secador de cabelo Taiff®
- Sílica gel 60 – Merck®
- Sonicador Thornton®
- Ultratermostatizador MA-184 - MARCONI®
- Vidrarias em geral (funil de separação, Erlemeyer, Kitassato, Becker)

4.2 Drogas e reagentes

- Acetona - Synth®
- Acetato de Etila - Nuclear®
- Ácido acético glacial - Merck®
- Ácido clorídrico - Merck®
- Ácido fórmico - Merck®
- Ácido sulfúrico - Merck®
- Ácido trifluoracético - Merck®
- Butanol – Casa americana®
- Clorofenicol - Proquimios®
- Clorofórmio deuterado - Merck®
- Clorofórmio P.A. - Merck®
- Dextrose - Labsynth®
- Etanol 96GL – Casa americana®
- Hexano - Nuclear®
- Itraconazol
- Meio de cultura Sabouraud - Merck®
- Meio de cultura Muller Hinton – Hinton Himedia Laboratories Put, limited®
- Metanol deuterado - Merck®
- Metanol P.A. – Casa americana®
- Óleo de oliva
- Óleo mineral
- Peptona – Bio-red®
- TCC - cloreto de trifeniltetrazolium - Merck®

4.3 Origem do material vegetal

As folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verl. (Figura 6) foram coletadas de cultura de propagação vegetativa com idade aproximada de 10 anos, localizada no setor de plantas medicinais e hortaliças da Embrapa Amazônia Ocidental na Rodovia AM 010, Km 29, que liga Manaus ao município vizinho de Itacoatiara em 01/10/2009 às 8:00h da manhã. A coleta foi realizada com o auxílio do pesquisador Dr. Francisco Célio M. Chaves.



Figura 6. Espécie *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae).

4.4 Secagem, extração e fracionamento

4.4.1 Processo de secagem

Os ramos de *Arrabidaea chica* foram cortados a uma altura de 10 cm em relação ao solo e em seguida as folhas foram separadas dos caules. As folhas foram

secas à temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) e na sombra durante 1 semana (Figura 7), foram trituradas em moinho industrial e armazenadas em sacos plásticos pretos. Foram separadas as excicatas, colocadas em jornal, isopor e madeira, levadas à estufa de ar forçado à 50°C durante 1 semana. As excicatas (Figura 8) após secagem foram encaminhadas ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Campus Manaus-Zona Leste (IFAM-CMZL), Avenida Cosme Ferreira, 8.045, São José Operário, Manaus/AM, recebidas e identificadas pelo Prof. Dr. Valdely Ferreira Kinupp, Fundador-Curador do Herbário EAFM. O depósito foi nomeado - Chaves, F.C.M. 1(EAFM2900), 2 (EAFM 2901); 3 (EAFM 2902).

O pó das folhas de *A. chica* (**Ac**) foi encaminhado ao Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto Biológico de São Paulo, para análises fitoquímicas, realizadas em conjunto com a Dra. Mitsue Haraguchi.



Figura 7. Folhas de *Arrabidaea chica* coletadas na Embrapa Amazônia Ocidental. A- Folhas separadas dos caules. B- Folhas secas após uma semana no ambiente.



Figura 8. Coleta da material vegetal. Separação das exsicatas e preparação para secagem em estufa de ar forçado.

4.4.2 Processo de extração

O pó das folhas de **Ac**, pesando 300 g foi extraído exaustivamente por maceração sob agitação manual em hexano, por 1 a 2 h, à temperatura de aproximadamente 22°C, na ausência de luminosidade; posteriormente, o material foi filtrado em papel de filtro pregueado, os extratos filtrados foram reunidos, concentrados totalmente em rotoevaporador BUCHI (sob pressão reduzida à aproximadamente 20°C) e secos para fornecer o resíduo do extrato hexânico designado **EH_{Ac}**, pesando 1,2408 g. Em seguida, o material vegetal retido no filtro (torta) foi extraído com clorofórmio, empregando os mesmos procedimentos descritos para extração hexânica, para obter o resíduo do extrato clorofórmico denominado **EC_{Ac}**, pesando 6,8618 g. Finalmente, o material vegetal foi extraído com etanol 92% usando o mesmo procedimento anterior para obter o resíduo do extrato etanólico designado **EE_{Ac}**, pesando 12,0629 g (Figura 9).

4.4.3 Processo de fracionamento do EE_{Ac}

O extrato EE_{Ac} foi dissolvido em água e extraído por partição consecutivamente em água/acetato de etila e água/butanol saturado com água, em ambiente isento de luminosidade e temperatura de aproximadamente 22°C, para obter fração de acetato de etila e fração butanólica, respectivamente. Cada uma das frações foi concentrada totalmente em rotoevaporador sob pressão reduzida à 20°C para fornecer resíduos da fração acetato de etila (FAE_{Ac}) e fração butanólica (FB_{Ac}), pesando respectivamente, 4,0 e 0,3 g.

4.4.4 Obtenção do extrato aquoso liofilizado

Em ambiente com ausência de luminosidade à temperatura de aprox. 22°C, o pó das folhas de **Ac**, pesando 10 g foi extraído com 100 mL de água destilada sob agitação empregando sonicador por 1 h, filtrado em gaze até esgotar. O extrato aquoso obtido foi centrifugado por 10 min a 5 000 rpm em centrífuga 5804R da marca Eppendorf® e a parte líquida recolhida. O sobrenadante foi recolhido e liofilizado em aparelho Liofilizador Thermo Electron Corporation – Thermo Fisher Scientific®, Modelo FR- Drying Digital Unit – Modulyod 115, para obter extrato aquoso denominado EA_{Ac} .

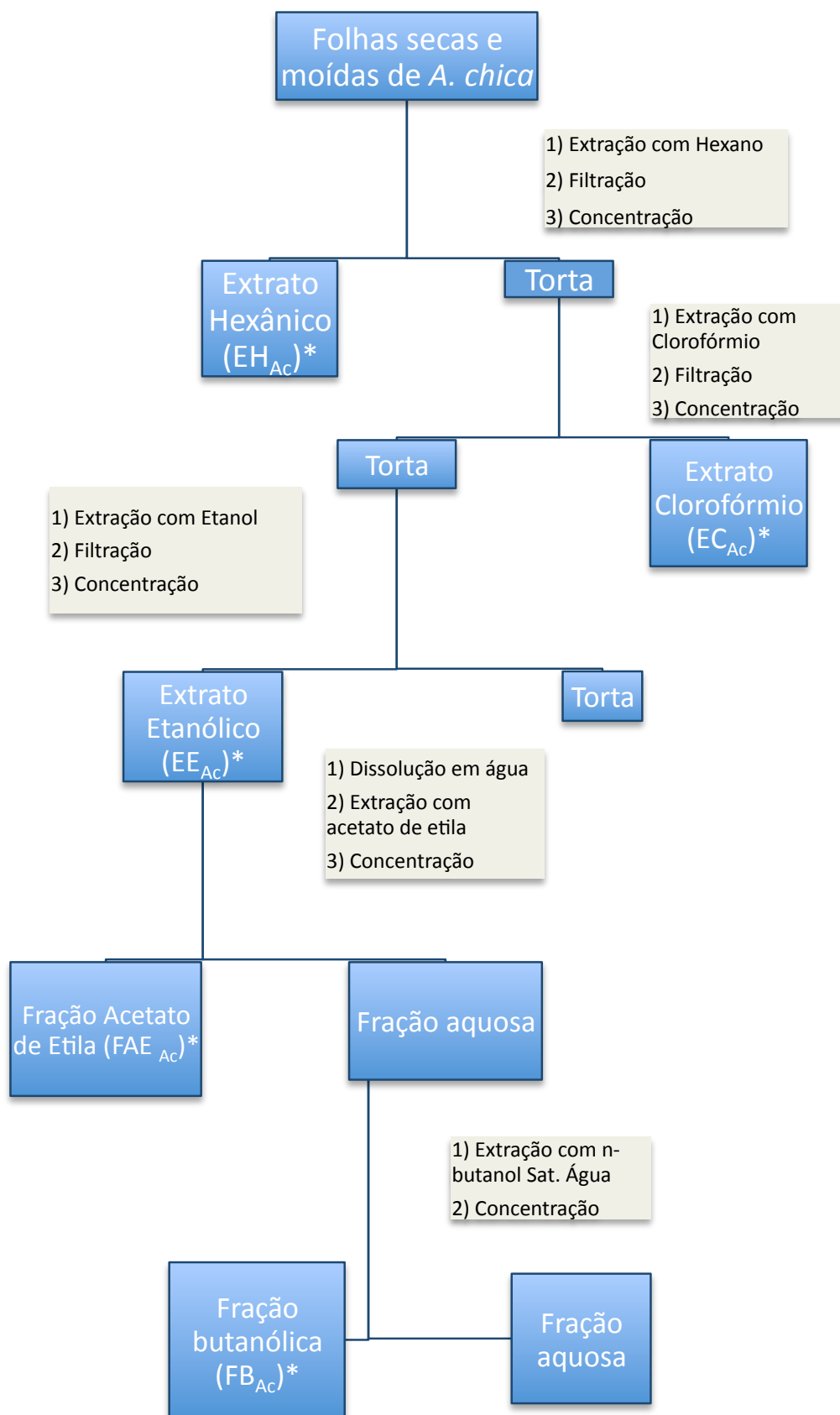


Figura 9. Representação gráfica dos métodos de extração e fracionamentos.

* Extratos e frações destinadas aos primeiros testes antimicrobianos.

4.4.5 Análises cromatográficas dos extratos e frações por Cromatografia de Camada Delgada

Os extratos hexânico (**EH_{Ac}**), clorofórmico (**EC_{Ac}**) e etanólico (**EE_{Ac}**) e frações de acetato de etila (**FAE_{Ac}**) e butanólica (**FB_{Ac}**) foram analisados por placas de CCD em sílica gel 60G (MERCK®) empregando como fase móvel os sistemas de solventes apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Sistemas de solventes empregados em CCD em placas de sílica gel 60G e celulose para eluição dos extratos e frações de **Ac**.

Sistemas	Fase Estacionária	Fase Móvel	Proporção
A	Sílica gel	acetato de etila : ácido acético glacial : ácido fórmico : água [EAFW]	100:11:11:26
B	Sílica gel	acetato de etila : ácido fórmico : ácido clorídrico 2N [EFW]	85:9:6
C	Sílica gel	Clorofórmio : acetona : ácido fórmico [CAAF]	7,5:1,6:0,8
D	Sílica gel	Clorofórmio : acetato de etila [CA1]	4:1
E	Celulose	n-butanol saturado com água : ácido acético glacial : água [BAW]	4:1:5
F	Celulose	ácido acético : ácido clorídrico conc. : água [AHW]	15:3:82
G	Sílica gel	Clorofórmio : metanol [CM]	75:5

As manchas foram visualizadas em lâmpada ultravioleta e através de reveladores, tais como: reagente de Dragendorff, solução de cloreto férrico 10% em meio alcóolico, cloreto de alumínio 10% em meio alcoólico e solução de ácido sulfúrico 10% seguido de aquecimento à 100°C.

4.4.6 Análises cromatográficas dos extratos e frações por cromatografia em coluna

Após a confirmação de atividade antimicrobiana dos extratos e frações obtidos através dos métodos de difusão em ágar e bioautografia (itens 4.5.4.1 e 4.5.4.2, respectivamente), esses foram submetidos a cromatografia em coluna (Figura 10) com a finalidade de separar os seus constituintes químicos. A FAE_{Ac} foi purificada em coluna de vidro com dimensão de 60 cm de comprimento e 4,5 cm de largura, empacotada com 80 g de sílica gel 60 (MERCK® Art. 7754, 70-230 mesh ASTM), eluída com clorofórmio seguida de mistura de clorofórmio e acetato de etila 3%, coletando frações de 50 mL cada. Cada fração obtida foi concentrada totalmente em rotoevaporador sob pressão reduzida à temperatura de 25°C. As frações coletadas totalizando 97, foram monitoradas em placas de vidro para cromatografia em camada delgada em sílica gel (1.05642-50 HPTLC – Platten Kiesigel – F254 da MERCK®) e sistema de solventes C conforme apresentado na Tabela 1 e as manchas visualizadas através de revelação com solução de ácido sulfúrico 10% seguida de aquecimento à 100°C. As frações semelhantes nas placas de CCD foram reunidas (Figura 12), o solvente foi evaporado totalmente em rotaevaporador (BUCHI) sob baixa pressão à temperatura aproximadamente de 25°C e o resíduo foi numerado em frascos (Figura 11) previamente tarados.

Em outra coluna de vidro com as mesmas dimensões de 60 cm de comprimento e 4,5 cm de largura, empacotado com sílica gel 60 (MERCK® Art. 7754, 70-230 mesh ASTM), pesando 100g foi aplicada 1g do **EC_{Ac}** eluindo com clorofórmio seguido de mistura de clorofórmio e acetona 5% e coletando frações de 100mL a 150mL cada. Cada fração obtida foi concentrada totalmente em rotaevaporador sob pressão reduzida à temperatura de 25°C, secada e pesada. As frações coletadas totalizando 19, foram monitoradas em CCD (1.05642-50 HPTLC – Platten Kiesigel – F254) e sistema de solventes C conforme apresentado na Figura 1 e visualizadas as manchas através de revelação com solução de ácido sulfúrico 10% seguido de aquecimento à 100°C.

As amostras reunidas foram novamente cromatografadas em camada delgada nas mesmas condições e calculado o fator de retenção (R_f) das manchas através da relação entre a distância percorrida do ponto de aplicação da amostra até o centro da mancha e a distância percorrida pela fase móvel, conforme a expressão abaixo:

$$R_f = \frac{\text{Distância (cm ou mm) percorrida pela substrato}}{\text{Distância (cm ou mm) percorrida pela fase móvel}}$$

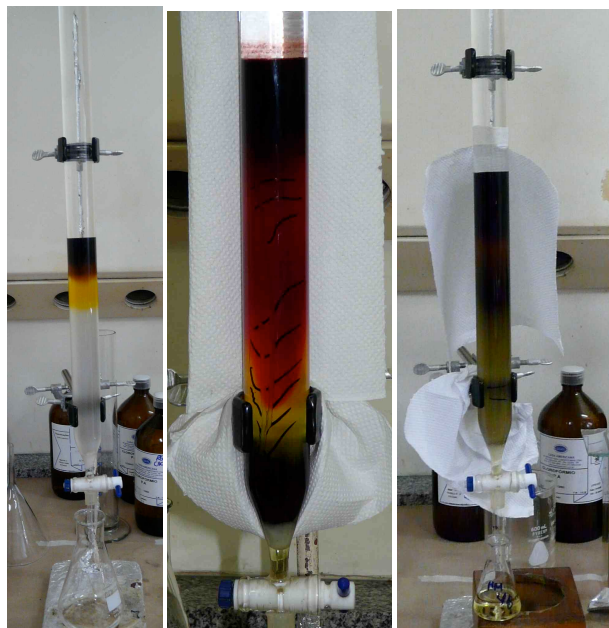


Figura 10. Cromatografia em coluna de sílica gel. A e B- Eluição da amostra fração acetato de etila (F_{AE_{Ac}}); e C- Eluição da amostra clorofórmio (E_{C_{Ac}}).



Figura 11. Frações obtidas da coluna cromatográfica da amostra F_{AE_{Ac}}.

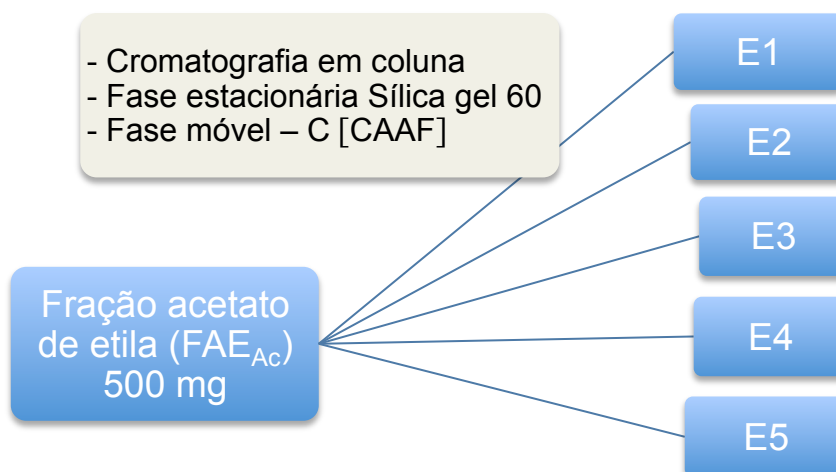


Figura 12. Esquema de fracionamento da fração FAE_{Ac} por cromatografia em coluna empacotada com sílica gel 60 e eluída com sistema CA1 (clorofórmio : acetato de etila - 4:1).

Após o término do fracionamento, todas as frações foram analisadas através de CCD (Cromatografia em Camada Delgada) e as frações semelhantes (R_f iguais), foram unidas e posteriormente testes *in vitro* foram realizados para verificar a atividade antimicrobiana das frações e compostos.

4.4.7 Separação dos constituintes químicos das frações por CCD preparativa

As frações com bons resultados nos testes de difusão em ágar e bioautografia foram aplicadas em placas cromatográficas em camada delgada preparativa para separação dos compostos ativos (Figura 13). Para isso, foram preparadas placas cromatográficas de vidro impregnadas com mistura de sílica gel 60 GP (MERCK®)

com espessura de 0,5 mm (preparador de placa da CAMAG), seguida de ativação em estufa a 100°C por 1 h. Posteriormente, foram aplicadas amostras das frações ativas, desenvolvidas no sistema de solvente C (CAAF) e as manchas visualizadas com uso de lâmpada ultravioleta e a olho nu (Figura 14). As manchas individualizadas foram raspadas do vidro, colocadas em recipiente de vidro para extração com solvente, filtradas e concentradas totalmente. Em seguida, foram analisadas em CCD, LC-MS (cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa), RMN (ressonância magnética nuclear de carbono) para verificação da pureza e submetidas a novos ensaios microbiológicos.

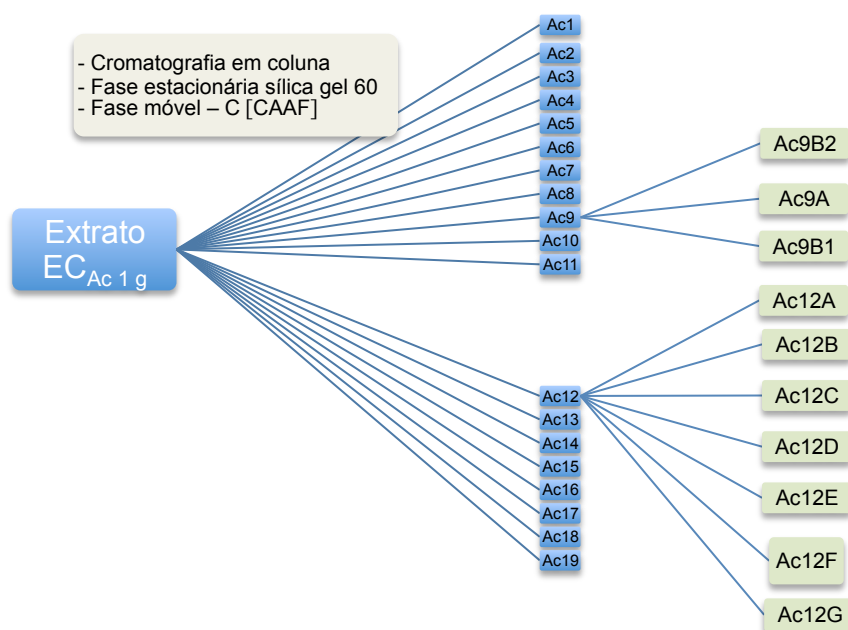


Figura 13. Fracionamento em coluna de vidro cromatográfica da amostra EC_{Ac}.

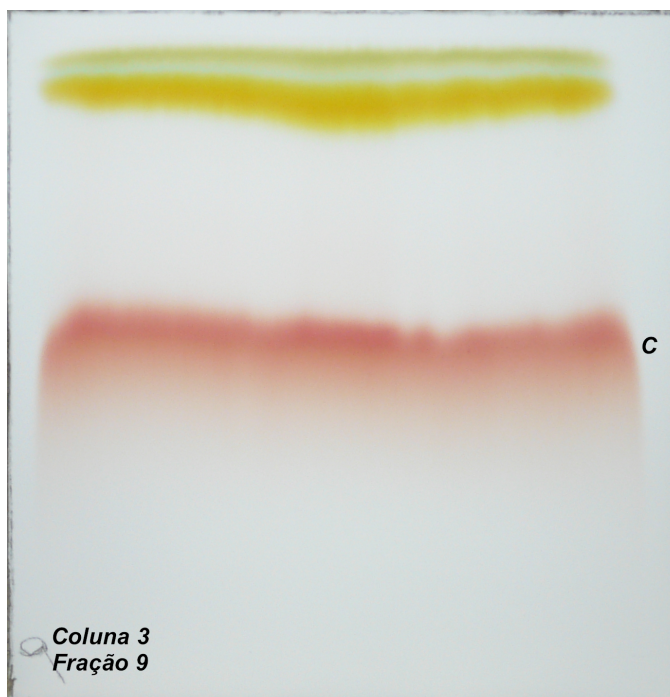


Figura 14. Cromatografia em camada delgada preparativa da Fração Ac9 em sílica gel 60G, fase móvel C (CAAF).

4.4.8 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear de carbono

As frações cromatográficas ativas foram analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (Shimadzu® – Japão), composto por 2 bombas LC-10AD, módulo de comunicação CBM-20A, detector espectrofotométrico UV-Vis SPD-M10AVP e espectrômetro de massas LCMS-2010EV. O sistema está acoplado a um computador, operado por software Shimadzu LCMS solution, versão 3.50 SP2. As mesmas amostras foram submetidas ao espectrômetro de ressonância magnética nuclear de carbono empregando o equipamento Bruker. As análises de LC-MS foram realizadas no Laboratório de Química vinculado ao Laboratório de Farmacologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.

A fase móvel consistiu de gradiente linear de água/metanol 15 a 95% durante 30 min, em coluna analítica Shimpack VP-ODS (150 x 2.0 mm) empacotada com partículas esféricas de 5 µm, eluída com fluxo constante de 0,2 mL/min. As amostras foram dissolvidas em água/metanol 15%, filtradas em filtro de 0,22 µM (Millipore – USA) e injetadas no cromatógrafo em alíquotas de 10 µL.

As mesmas frações ativas foram submetidas ao espectrômetro de ressonância magnética nuclear de carbono empregando o equipamento Bruker operando a 125 MHz. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado com uma gota de metanol deuterado. As análises de RMN foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Os testes antimicrobianos foram realizados na Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Leônidas e Maria Deane, Laboratório de Biodiversidade, em Manaus.

4.5.1 Microrganismos

4.5.1.1 Coleta e identificação dos microrganismos isolados de animais domésticos

Foram avaliados inóculos de cepas de agentes causais de dermatites e micoses superficiais de animais domésticos (caninos e felinos), dermatófitos e leveduras, isolados a partir de materiais clínicos (raspado cutâneo – pêlo e crostas) coletados em pacientes da Clínica Veterinária ProntoVet de Manaus-AM. As

amostras foram coletadas de 20 cães e 8 gatos com lesões características de dermatites e/ou micoses superficiais.

4.5.2 Autenticação das culturas em nível de espécie

Foi utilizada a técnica de microcultivo para fungos filamentosos. Em uma placa de Petri estéril foi adicionado o meio de cultura ágar Sabouraud, a lâmina foi montada mediante o corte com bisturi, de blocos de 5 mm x 5 mm de ágar Sabouraud, onde o fungo foi semeado, a partir de repique recente, no cubo e na placa de ágar e recoberto com uma lamínula estéril. A placa foi tampada e colocada em estufa com temperatura controlada durante 15 dias a 25°C, até que se observou o desenvolvimento de hifas com ou sem pigmentação. Após crescimento adequado, a lamínula, com o micélio aderido, foi removida do bloco de ágar (Figura 15), montada sobre uma lâmina contendo o corante lactofenol azul-algodão (Quadro 2), e examinada ao microscópio óptico (SIDRIM et al., 2004). O material originado de dermatopatias de cães e gatos foi identificado fenotipicamente de acordo com os autores Quinn et al. (2005).

Quadro 2. Preparação do corante azul de lactofenol-algodão.

Corante Azul de lactofenol- algodão
Ácido láctico 20 g
Cristais de fenol 20 g
Glicerina 20 g
Azul algodão 0,05 g
Água destilada 20 g

Após identificação pelo método do microcultivo, os materiais que continham os fungos *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* (da espécie canina e felina), e as leveduras *Candida albicans* e *Mallassezia pachydermatis* foram conservados e depositados na coleção da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/AM – Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane. As amostras foram depositadas na CFAM e receberam as seguintes numerações: *Trichophyton mentagrophytes* CFAM 1288; *Microsporum canis* CFAM 1289; *Malassezia pachydermatis* CFAM 1290; e *Candida albicans* CFAM 1285.

A **Coleção de Fungos da Amazônia, CFAM**, que está inserida na Coleção Biológica do Instituto Leônidas e Maria Deane (CBILMD), possui um acervo de relevante importância, uma vez que é composta de linhagens isoladas de diferentes substratos da Amazônia brasileira, região ainda pouco explorada quanto à sua riqueza microbiana. A CFAM é filiada a *World Federation for Culture Collection, WFCC*, sob o registro WDCM 957.

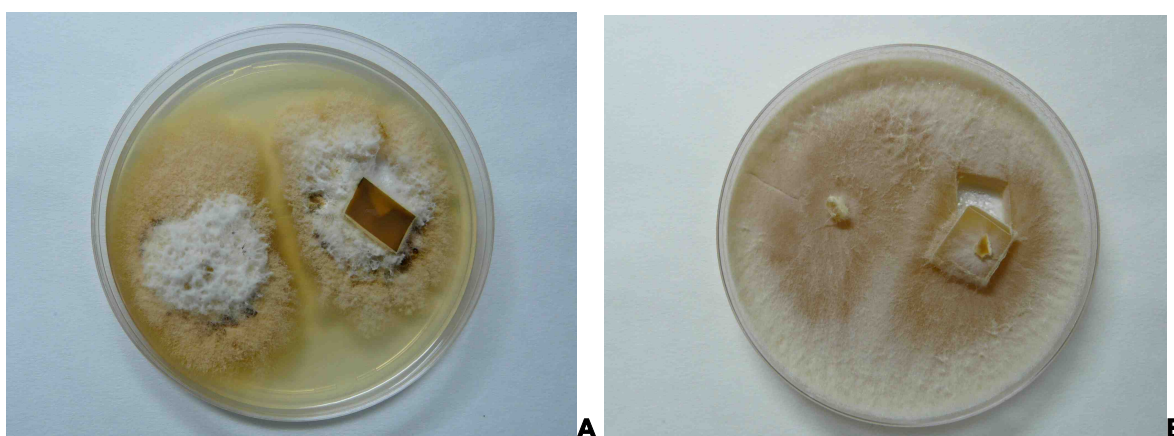


Figura 15. Técnica de microcultivo para identificação dos fungos isolados de raspados cutâneos de animais domésticos. A- Microcultivo de *Microsporum canis*; e B- Microcultivo de *Trichophyton mentagrophytes*.

As bactérias utilizadas para os testes foram adquiridas da **Coleção de Bactérias da Amazônia, CBAM**, que está inserida na Coleção Biológica do Instituto

Leônidas e Maria Deane, CBILMD, é constituída por um patrimônio de significância científica. O acervo composto de bactérias da Amazônia, inclui 340 isolados identificados e conservados pelos métodos de óleo mineral, a -20°C e liofilização. As bactérias do acervo utilizadas neste trabalho, foram as seguintes: *Staphylococcus aureus* CBAM 324; *Escherichia coli* CBAM 002; *Pseudomonas aeruginosa* CBAM 232; e *Staphylococcus epidermidis* CBAM 293.

4.5.3 Reativação das culturas preservadas

Das culturas de fungos preservadas em água destilada e leveduras preservadas em óleo mineral, foram retiradas frações e transferidas para placas contendo meio de cultura específico (Tabela 2).

Tabela 2. Constituintes dos meios de cultura sólidos para fungos filamentosos e leveduras.

Meio ágar Saboraud, descrito por Lacaz et al., 2002		
Peptona	10 g/L	Bio-Red®
Dextrose	30 g/L	Labsynth®
Ágar bacteriológico	30 g/L	MERCK®
Cloranfenicol	100 µg	Proquimios®
Meio ágar Saboraud e óleo de oliva, descrito por Lacaz et al., 2002		
Peptona	10 g/L	Bio-Red®
Dextrose	30 g/L	Labsynth®
Ágar bacteriológico	30 g/L	MERCK®
Cloranfenicol	100 µg	Proquimios®
Óleo de Oliva	10 mL	

A peptona, a dextrose e o ágar foram dissolvidos em água destilada e o material autoclavado por 15 minutos a 121°C. Essa formulação utilizou antibióticos (cloranfenicol) de largo espectro visando inibir o crescimento de bactérias, eventualmente presentes em materiais clínicos, as quais, por possuírem maior velocidade de crescimento, podem esgotar o substrato do meio e impedir o crescimento de fungos.

Das culturas de bactérias preservadas, foram retiradas frações e transferidas para placas contendo o seguinte meio de cultivo apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Constituintes do meio de cultura sólido para bactérias.

Meio ágar Mueller-Hinton, descrito por Lacaz et al., 2002		
Meio ágar Mueller*	38 g/L	Hinton Himedia
		Laboratories Put,
		limited®

*O Meio de cultivo foi dissolvido em água destilada e autoclavado por 15 minutos a 121°C.

Para a confirmação das características macroscópicas, as placas foram mantidas em estufa a 25°C, por 15 dias para fungos filamentosos, 48h para leveduras e 24 h para bactérias em 37°C. As microestruturas foram observadas em lâminas obtidas por microcultivo. Para o reconhecimento das características da espécie foram utilizadas metodologias para identificação fenotípica de acordo com Quinn et al. (2005) e Lacaz et al. (2002).

4.5.4 Obtenção e caracterização das substâncias antimicrobianas

4.5.4.1 Método de Difusão em Ágar pela técnica do poço

O método de difusão em ágar consiste na semeadura em meio de cultura sólido, geralmente ágar Mueller-Hinton para bactérias, ágar Sabouraud para fungos filamentosos e *Candida albicans* ou ágar Sabouraud com óleo de oliva para *Malassezia pachydermatis*. Foram preparadas suspensões celulares de microrganismos em tubos de ensaio contendo água estéril, com densidade semelhante à coluna nº1 da escala de MacFarland (ALVES et al., 2008; NCCLS, 2003). Após a solidificação do meio foram inoculados 100 µL da suspensão celular e espalhados pela placa com um “swab” estéril. Os poços foram feitos com auxílio de um tubo de ensaio pequeno de vidro estéril no meio ágar (Figura 16). Os extratos EH_{AC}, EC_{AC}, EE_{AC}, EA_{AC} e frações FAE_{AC}, FB_{AC} na concentração de 50 mg/mL foram dispensados diretamente nos poços. Para o controle negativo foram utilizados os solventes etanol, cloroformio e água estéril e para o controle positivo itraconazol para fungos e leveduras e cloranfenicol para bactérias (1 mg/mL MERCK®) (SILVA et al., 2010). Os testes foram realizados em triplicata.

As placas foram colocadas em estufa com temperatura controlada de 25°C para fungos filamentosos e leveduras durante 15 dias e 48 h respectivamente. As placas-testes contendo as bactérias foram mantidas em estufa durante 24 horas à 37°C. Após o tempo determinado foram medidos os halos de inibição do crescimento dos microrganismos. A maioria dos autores considera significativo o halo maior que 9 mm (ISHIKAWA, 2001).

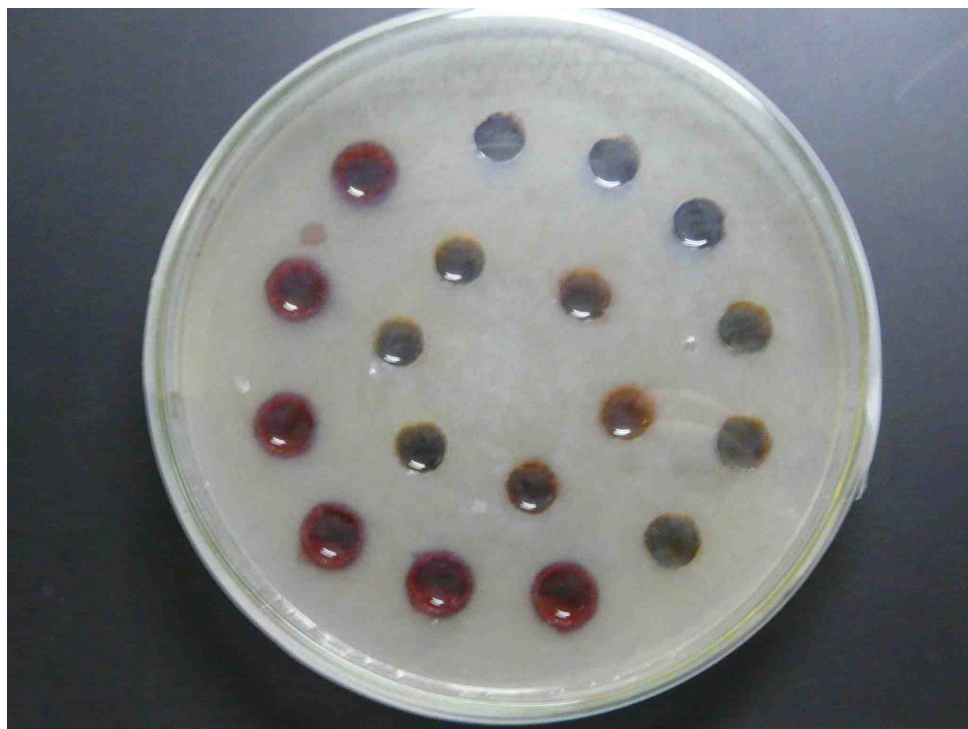


Figura 16. Placa representando o método de difusão em ágar pela técnica do poço.

4.5.4.2 Bioautografia

Os extratos orgânicos e frações que se mostraram ativos nos testes de difusão em ágar, foram redissolvidos com o solvente extrativo para a determinação do perfil cromatográfico e teste de bioautografia adaptada de Alves et al. (2001) e Holetz et al. (2002). Nos ensaios bioautográficos, em cada placa de cromatografia de camada delgada (CCD) de sílica gel 60 F254 (MERCK®), foram aplicados com capilar os padrões (itraconazol para fungos e cloranfenicol para bactérias como controle positivo; e solventes orgânicos como controle negativo) e os extratos orgânicos (EH_{Ac}; EC_{Ac}; EE_{Ac}; FAE_{Ac}; FB_{Ac}; EA_{Ac}). Os cromatogramas foram desenvolvidos em 4 sistemas de eluição: 1- ácido trifluoacético 2% : metanol (10:90) em 9 placas de fase reversa (MERCK®); 2 – clorofórmio : acetona : ácido fórmico (7,5:1,6:0,8) em 9 placas de sílica gel em fase normal (MERCK®); 3 – ácido acético glacial : ácido clorídrico : água (1,5:0,3:8,2) em 9 placas de celulose (MERCK®); e 4

– clorofórmio : acetato de etila (4:1) em 9 placas de sílica gel de fase normal (MERCK®). As placas foram secas em capela e, posteriormente, observadas sob a luz ultravioleta para determinar as bandas dos metabólitos secundários. Os respectivos R_f (fator de retenção) foram determinados nas bandas visualizadas nas placas usadas como controle.

Para determinação da atividade antimicrobiana por bioautografia em condições assépticas, foram utilizados 20 mL dos meios de ágar Mueller Hilton para bactérias, ou ágar Sabouraud a 40°C para fungos ou ágar Sabouraud mais óleo de oliva para leveduras, suplementados com 500 µL de suspensão celular de cada microorganismo com densidade semelhante à coluna n°1 da escala de MacFarland e 500 µL de cloreto de trifeniltetrazolium 1,0% (MERCK®). Depois da homogeneização da mistura, foram vertidos em cima do cromatograma colocado em placas de Petri (Figura 17). Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas em estufa com temperatura controlada de 25°C para fungos (durante 15 dias no máximo), para leveduras (48 h) e para bactérias 37°C (24 h). A atividade antimicrobiana foi avaliada visualizando-se a área de inibição de 0,4 mg de cada extrato e fração aplicada nas placas de cromatografia (SPOONER e SYKES, 1972; KUJUMGIEV et al., 1993).

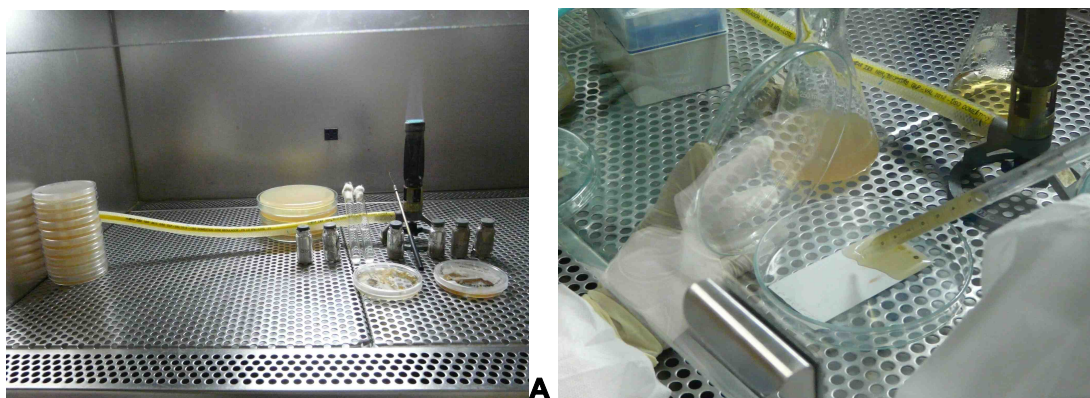


Figura 17. Metodologia empregada para os testes de bioautografia. A- fluxo laminar e materiais; B- meios de cultura contendo os microorganismos e TCC sendo vertido sobre placa de cromatografia dentro de uma placa de petri.

4.5.4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo

Em microplacas estéreis de 96 orifícios foram adicionados 100 µL de meio de cultura líquido (caldo) em todos os orifícios. Na linha A da placa foram adicionadas as amostras (100 µL) dos compostos ativos a serem analisados na concentração de 100 µg/mL. Em seguida, com uma pipeta de microdiluição de 12 canais, foram feitas as diluições seriadas, transferindo-se 100 µL da linha A para a linha B, e assim sucessivamente até a linha F da placa, sendo que a linha G reservada para o solvente utilizado para solubilizar as amostras (etanol - controle negativo), e a linha H, mantida sem amostras de compostos ativos, utilizando o cloranfenicol (40 µg/mL) para bactérias e o itraconazol (0,005 mg/mL) para os fungos como controle positivo (SOUZA et al., 2004; TELLES e MOSCA, 2000). A seguir foram inoculados 25 µL da suspensão celular de cada microorganismo com densidade semelhante à coluna nº1 da escala de MacFarland e 25 µL de cloreto de trifeniltetrazolium 1,0% (MERCK®) como solução indicadora em cada um dos orifícios da placa. As placas foram seladas e incubadas a 25 e 37°C, para fungos e bactérias, respectivamente. A CIM foi determinada como a menor concentração do composto ativo capaz de impedir a mudança de cor, ou seja, de inibir o crescimento celular. Os testes foram realizados em triplicata. A CIM 50% foi definida como a menor concentração capaz de inibir 50% dos isolados.

4.5.4.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para determinar a concentração bactericida mínima (CBM), nos poços onde não ocorreu crescimento visível dos microrganismos foram realizadas subculturas, com uma alíquota de 10 µl, semeados na superfície do ágar Muller-Hinton, ou ágar Sabouraud. Após 48 h de incubação a 35°C para bactérias e 15 dias a 27°C para fungos, foi determinada a concentração bactericida mínima como a menor concentração das amostras capaz de causar a morte do inóculo.

Para a interpretação dos resultados considerou-se que, ação bacteriostática seria a inibição no ensaio do MIC, mais o crescimento do microrganismo na subcultura (CBM) e a ação bactericida a ausência de crescimento na subcultura (BARON e FINEGOLD, 1990).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos a análise estatística descritiva, no Excel: MAC – 2008 e o programa STATISTICA 7.0. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

6. RESULTADOS

6.1 Rendimentos e propriedades físico-químicas dos extratos e frações purificadas

A obtenção dos extratos, o fracionamento e as análises cromatográficas, foram realizados em ambiente sem luminosidade e temperatura ao redor de 22°C para evitar alteração química dos metabólitos secundários, principalmente das antocianidinas (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Os extratos hexânico (EH_{Ac}), clorofórmico (EC_{Ac}) e etanólico (EE_{Ac}), tiveram os rendimentos apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Rendimentos dos diferentes extratos obtidos de folhas moídas de *A. chica*.

Extratos e Frações	Peso(g)	Rendimento (%)*
EH _{Ac}	1,2408	0,41
EC _{Ac}	6,8618	2,30
EE _{Ac}	12,0629	4,02
FAE _{Ac}	4,0125	1,34
FB _{Ac}	0,3123	0,10
EA _{Ac}	1,1301	11,3

EH_{Ac} = extrato hexânico; EC_{Ac} = extrato clorofórmico; EE_{Ac} = extrato etanólico; FAE_{Ac} – Fração acetato de etila; FB_{Ac} = fração butanólica; EA_{Ac} = extrato aquoso.

*% relativa ao peso inicial do pó da folha de *A. chica* (300g)

Os extratos e frações foram desenvolvidos em placas cromatográficas (Figura 19) de sílica gel e celulose envolvendo diferentes sistemas de solventes (Quadro 3). Os cromatogramas dos extratos EH_{Ac}, EC_{Ac}, EE_{Ac} e EHA_{Ac} em placas de sílica gel no sistema de solventes C (CAAF) revelados com o reagente de Dragendorff (indicativo da presença de alcalóide); com solução de cloreto férrico em meio alcohólico, com vapores de amônia e com solução de cloreto de alumínio em meio alcohólico (indicativo de flavonóides), não apresentaram manchas características,

indicando ausência de substâncias de natureza alcaloidal e flavonoídica. A revelação com ácido sulfúrico 10% seguida de aquecimento a 100°C (indicativo de presença de terpenos e esteróides), e vapores de iodo (indicativo da presença de compostos com carbonos insaturados), mostraram manchas definidas (Tabela 5 e Figura 19). A visualização de manchas a olho nu, de coloração amarelada a vermelha, dos extratos de Ac, possivelmente dá indicação da presença de antocianidinas (WILLIAMS e GRAYER, 2004).

Os cromatogramas dos extratos EC_{Ac}, EE_{Ac} e das frações FAE_{Ac} e FB_{Ac}, além de EA_{Ac} desenvolvidos nas placas de sílica gel e celulose nos sistemas de solventes C e D e reveladas com ácido sulfúrico 10% mostraram:.

- o EC_{Ac} e a EE_{Ac} pelo menos 6 manchas indicativas de terpenos nos seguintes valores de retenção: vermelha, Rf = 0,17; vermelha, Rf = 0,3; vermelha, Rf = 0,43; vermelha, Rf = 0,47; verde, Rf = 0,5; vermelha, Rf = 0,76; verde, Rf = 0,82 e mancha com coloração azul escuro, Rf = 0,6 possivelmente de natureza esteroidal.
- a FB_{Ac} forneceu uma mancha vermelha com Rf de 0,12
- o EA_{Ac} uma cauda vermelha.
- a FAE_{Ac} mostrou manchas vermelha, Rf = 0,13; vermelha, Rf = 0,22; vermelha, Rf = 0,31; amarela Rf = 0,5; verde, Rf = 0,56; e verde, Rf = 0,89.

A Figura 18 apresenta um cromatograma de EC_{Ac}, do padrão ácido oleanólico, da FAE_{Ac} e do EE_{Ac}, desenvolvido em sistema C (Tabela 1) e revelado com solução de ácido sulfúrico 10 % seguida de aquecimento. A amostra de EC_{Ac} apresentou entre diversas manchas, uma mancha com Rf de 0,625 de coloração magenta similar ao padrão de ácido oleanólico, indicando a presença deste triterpeno comum na família Bignoniaceae e talvez de um derivado.

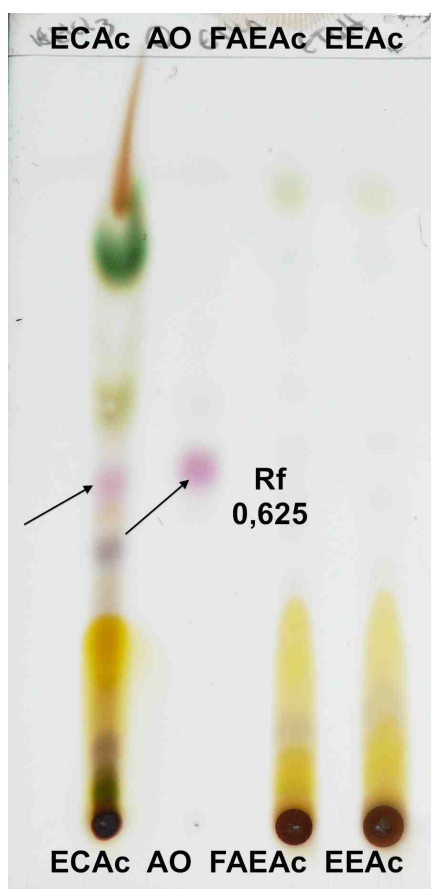


Figura 18. Cromatograma das amostras de extratos clorofórmico (EC_{Ac}), padrão ácido oleanólico, fração acetato de etila (FAE_{Ac}) e extratos etanólico (EE_{Ac}), em sílica gel desenvolvida no sistema C [CAAF] e reveladas com solução de ácido sulfúrico 10% seguido de aquecimento a $100^{\circ}C$. Notar a semelhança das manchas indicadas pelas setas.

Tabela 5. Cromatogramas dos extratos de *A. chica* em diferentes sistemas de solventes.

Sistema de solventes	Visualização/Revelação	EH _{Ac}	EC _{Ac}	EE _{Ac}	EHA _{Ac}
A	Sem revelação	cauda (verde, vermelho)	cauda (verde, vermelho)	cauda (verde, vermelho)	cauda (verde, vermelho)
B	Sem revelação	cauda (verde, vermelho)	cauda (verde, vermelho)	cauda (verde, amarelo, vermelho)	cauda (vermelho claro)
C	Sem revelação	vermelho Rf = 0,18 amarelo Rf = 0,56 verde Rf = 0,68	vermelho Rf = 0,12 vermelho Rf = 0,37 verde Rf = 0,95	vermelho Rf = 0,087 vermelho Rf = 0,31 verde Rf = 0,97	vermelho/ alaranjado Rf = 0,11
	Dragendorff	negativo	negativo	negativo	negativo
	Cloreto férrico 10%	negativo	negativo	negativo	negativo
	Cloreto de alumínio 10%	negativo	negativo	negativo	negativo
	Hidróxido de amônio	negativo	negativo	negativo	negativo
	Ácido sulfúrico 10%	negativo	amarelo Rf = 0,062 amarelo Rf = 0,15 amarelo Rf = 0,37 cinza Rf = 0,5 verde Rf = 0,56 azul Rf = 0,62 magenta Rf = 0,75 verde Rf = 0,85	vermelho Rf = 0,17 vermelho Rf = 0,3 vermelho Rf = 0,43 vermelho Rf = 0,47 verde Rf = 0,5 verde Rf = 0,76	negativo
	Iodo	negativo	negativo	negativo	negativo

Tabela 5. Cromatogramas dos extratos de *A. chica* em diferentes sistemas de solventes.
(Continuação)

D	Sem revelação	cauda (verde, vermelho)	cauda (verde, vermelho)	cauda (verde, vermelho)	negativo
E	Sem revelação	laranja Rf = 0,25	laranja Rf = 0,31	laranja Rf = 0,18 laranja Rf = 0,33	laranja Rf = 0,1
F	Sem revelação	negativo	amarelo Rf = 0,32	amarelo Rf = 0,17 amarelo/ alaranjado Rf = 0,32	laranja Rf = 0,15

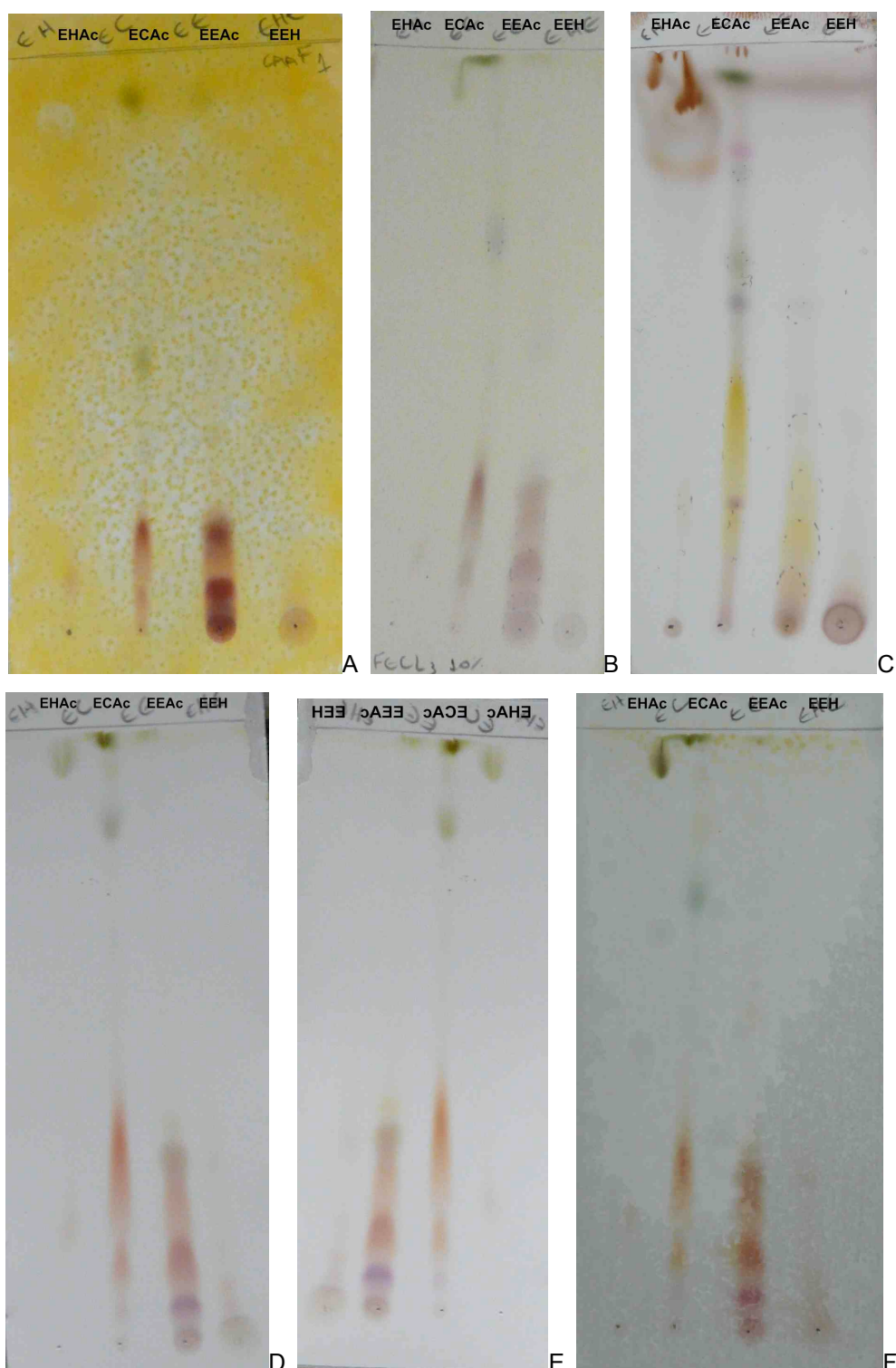


Figura 19. Cromatogramas dos extratos hexânico (EH_{Ac}), clorofórmico (EC_{Ac}), etanólico (EE_{Ac}) e hidroalcolólico (EH_{Ac}) em sílica gel desenvolvidos no sistema C [CAAF] e revelados com reagente de Dragendorff [A], solução alcoólica de cloreto férrico [B], vapores de amônia [C], solução alcoólica de cloreto de alumínio [D], solução de ácido sulfúrico 10% seguida de aquecimento [E] e vapores de iodo [F].

Posteriormente, diante dos resultados obtidos nos testes de difusão em ágar e na bioautografia, foi realizado o fracionamento em coluna cromatográfica da fração acetato de etila (FAE_{Ac}) (Tabela 6) e do extrato clorofórmico (EC_{Ac}) (Tabela 7).

Tabela 6. Frações obtidas em coluna cromatográfica da fração acetato de etila (FAE_{Ac}), eluída em sistema de solvente CA1 (clorofórmio : acetato de etila – 4:1).

Frações finais	Frações reunidas*	Peso (g) – Rendimento (%)**
E1	14-20	0,0116 – 2,4
E2	21-27	0,0022 – 0,4
E3	41-58	0,0069 – 1,4
E4	67-79	0,0084 – 1,6
E5	59-60	0,0009 – 0,2

* as amostras foram reunidas de acordo com a semelhança no R_f.

**% relativa ao peso da FAE_{Ac} (500 mg) fracionada em coluna cromatográfica.

Tabela 7. Frações obtidas em coluna cromatográfica do (EC_{Ac}), eluída em sistema de solvente CAAF (clorofórmio : acetona : ácido fórmico – 7,5:1,6:0,8).

Frações finais	Peso (g)	Rendimento (%)*
Ac1	0,0568	5,68
Ac2	0,0114	1,14
Ac3	0,0101	1,01
Ac4	0,0077	0,77
Ac5	0,1139	11,39
Ac6	0,025	2,5
Ac7	0,0195	1,95
Ac8	0,0240	2,40
Ac9	0,0751	7,51
Ac10	0,0844	8,44
Ac11	0,0616	6,16
Ac12	0,0216	2,16
Ac13	0,0583	5,83
Ac14	0,0235	2,35
Ac15	0,2261	22,61
Ac16	0,1238	12,38
Ac17	0,0805	8,05
Ac18	0,1381	13,81
Ac19	0,1609	16,09

*% relativa ao peso do EC_{Ac} (1 g) fracionada em coluna cromatográfica.

Ac9 e **Ac12** frações purificadas em placas de cromatografia em camada delgada preparativa.

Durante o fracionamento em coluna cromatográfica as frações obtidas foram acompanhadas através de placas de CCD de silica gel em vidro (MERCK®) para determinarmos através dos R_fs as frações semelhantes. As frações obtidas nas duas colunas cromatográficas da FAE_{Ac} e do EC_{Ac}, foram submetidas a novos testes de bioautografia, que determinaram o melhor fracionamento e possíveis manchas com atividade e seu tempo de retenção.

As manchas com Rfs que mais se aproximavam daqueles Rfs positivos nos testes de bioautografia foram separadas através de placas de cromatografia preparativa (Figura 20).

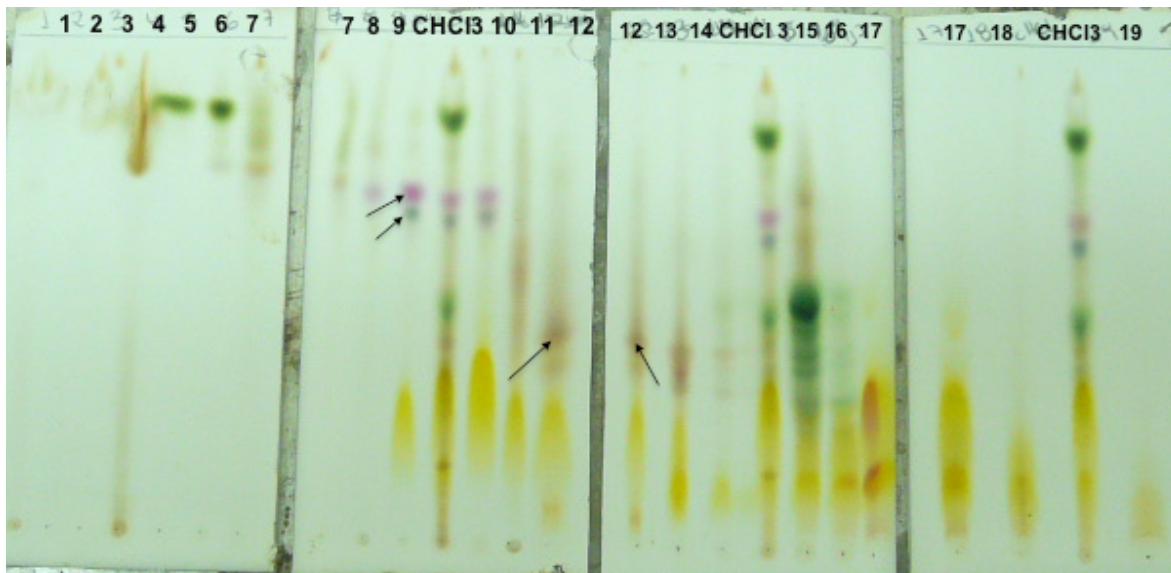


Figura 20. Acompanhamento das frações obtidas através de coluna cromatográfica da amostra **EC_{Ac}** aplicadas em placas de CCD de silica gel em vidro (MERCK®), revelada com ácido sulfúrico 10% e aquecidas a 100°C. Setas: indicam as manchas que possivelmente apresentaram atividade. Frações Ac1 a Ac19 e padrão do **EC_{Ac}** no centro da placa.

Os resultados obtidos com a Ac9 e a Ac12 estão mostrados na Figura 21. Depois de extraídas das placas preparativas as subfrações obtidas de Ac9 e Ac12 foram recromatografadas em CCD de silica gel e os resultados mostraram a total concordância com as manchas selecionadas das frações Ac9 e Ac12 (Figura 21).

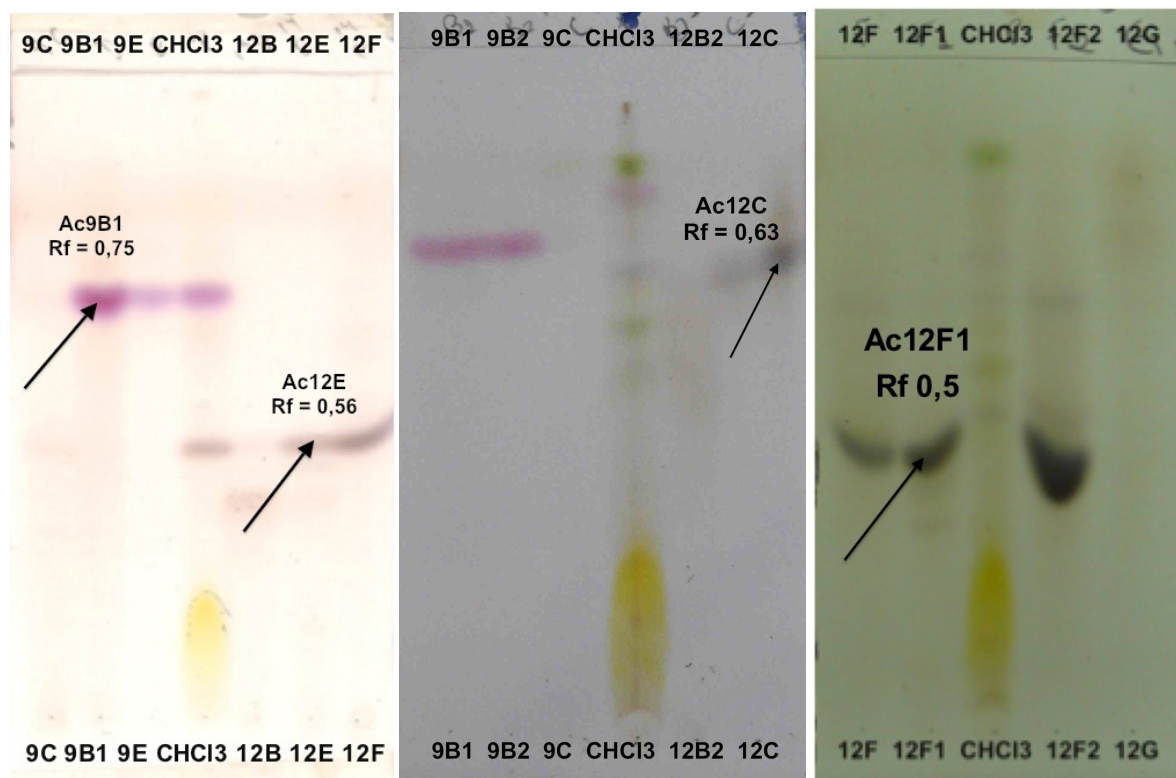


Figura 21. Placas de CCD mostrando as manchas e fatores de retenção (Rf) das subfrações de Ac9 e Ac12, extraídas das placas preparativas de sílica gel eluídas em sistema de solvente C (CAAF). O extrato original EC_{Ac} (CHCl₃) foi aplicado no centro da placa. As setas indicam as manchas com Rfs de interesse (Ac9B1, Rf=0,75; Ac12E, Rf=0,56; Ac12C, Rf=0,63; e Ac12F1, Rf=0,5). As demais subfrações (Ac9C, Ac9E, Ac12B, Ac12F1, Ac9B2, Ac9C, Ac12B2, Ac12F, Ac12F2 e Ac12G) mostraram indicativos de impurezas.

A mancha da subfração purificada **Ac9B1** em CCD mostrou semelhança com o padrão de ácido oleanólico, como mostrado anteriormente (Figura 18).

Para confirmação da atividade antimicrobiana das subfrações purificadas, foram realizados os testes de bioautografia e os testes para determinação da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima.

6.2 Atividade Antimicrobiana

Os raspados cutâneos coletados de cães e gatos atendidos na clínica veterinária foram identificados com a prevalência de *Microsporum canis* em 5% dos cães e em 10% dos gatos, 5% de *Trichophyton mentagrophytes* em cães, e de 10% de *Malassezia pachydermatis* em cães. Nessas amostras, foram encontrados diversos fungos de ambiente, leveduras e bactérias, como: fungos - *Cladosporum sp*, *Phialofora sp*, *Onychocola sp*, *Curvularia sp*, *Rhizopus sp*, *Mucor sp*, *Fusarium sp*, *Aspergillus sp*, *Absidia sp*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*; leveduras - *Candida albicans*, *Mallassezia pachydermatis*; e bactérias do gênero *Staphylococcus sp* (Tabela 8).

Tabela 8. Prevalência dos dermatófitos, fungos de ambiente e leveduras em isolados a partir de amostras clínicas de cães e gatos com lesões características de dermatites e micoses superficiais.

Fungo	Total	Cão (%) n=20	Gato (%) n=8
<i>Absidia sp</i>	1	5	-
<i>Aspergillus sp</i>	2	5	5
<i>Candida albicans</i>	3	15	-
<i>Cladosporum sp</i>	3	15	-
<i>Curvularia sp</i>	2	5	5
<i>Fusarium sp</i>	1	5	-
<i>Mallassezia pachydermatis</i>	2	10	-
<i>Microsporum canis</i>	3	5	10
<i>Mucor sp</i>	3	5	10
<i>Onychocola sp</i>	1	5	-
<i>Phialofora sp</i>	1	5	-
<i>Rhizopus sp</i>	3	10	5
<i>Rhodotorula sp</i>	1	5	-
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1	5	-

6.2.1 Atividades avaliadas com o método de difusão em ágar

O método de difusão em Ágar Saboraud pela técnica do poço em triplicata não mostrou atividade de nenhum extrato (EC_{Ac} , EE_{Ac} , FAE_{Ac} e FB_{Ac}) contra o *Trichophyton mentagrophytes* CFAM 1288.

Foi realizado como teste antibacteriano o método de difusão em ágar Muller Hinton pela técnica do poço para a bactéria *Staphylococcus epidermidis*. Na Figura 23, observamos halos de inibição de 16,1 mm para o extrato EC_{Ac} ; 16,5 mm para o extrato EE_{Ac} ; 16,6 mm para a fração FAE_{Ac} ; 16,2 mm para a fração FB_{Ac} ; 20,2 mm para o controle positivo (cloranfenicol); e resistente (R) para o extrato EA_{Ac} . Os extratos EH_{Ac} e EA_{Ac} não mostraram atividade contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto os extratos EC_{Ac} , EE_{Ac} , FAE_{Ac} e FB_{Ac} apresentaram os seguintes halos de inibição: 11,2 mm; 11,1 mm; 11,2 mm; e 11,4 mm, respectivamente (Figura 22). O controle positivo (cloranfenicol) teve um halo de inibição de 20,3 mm (Tabela 9). Os testes foram realizados em triplicata e visualizados após 24hs com lupa.

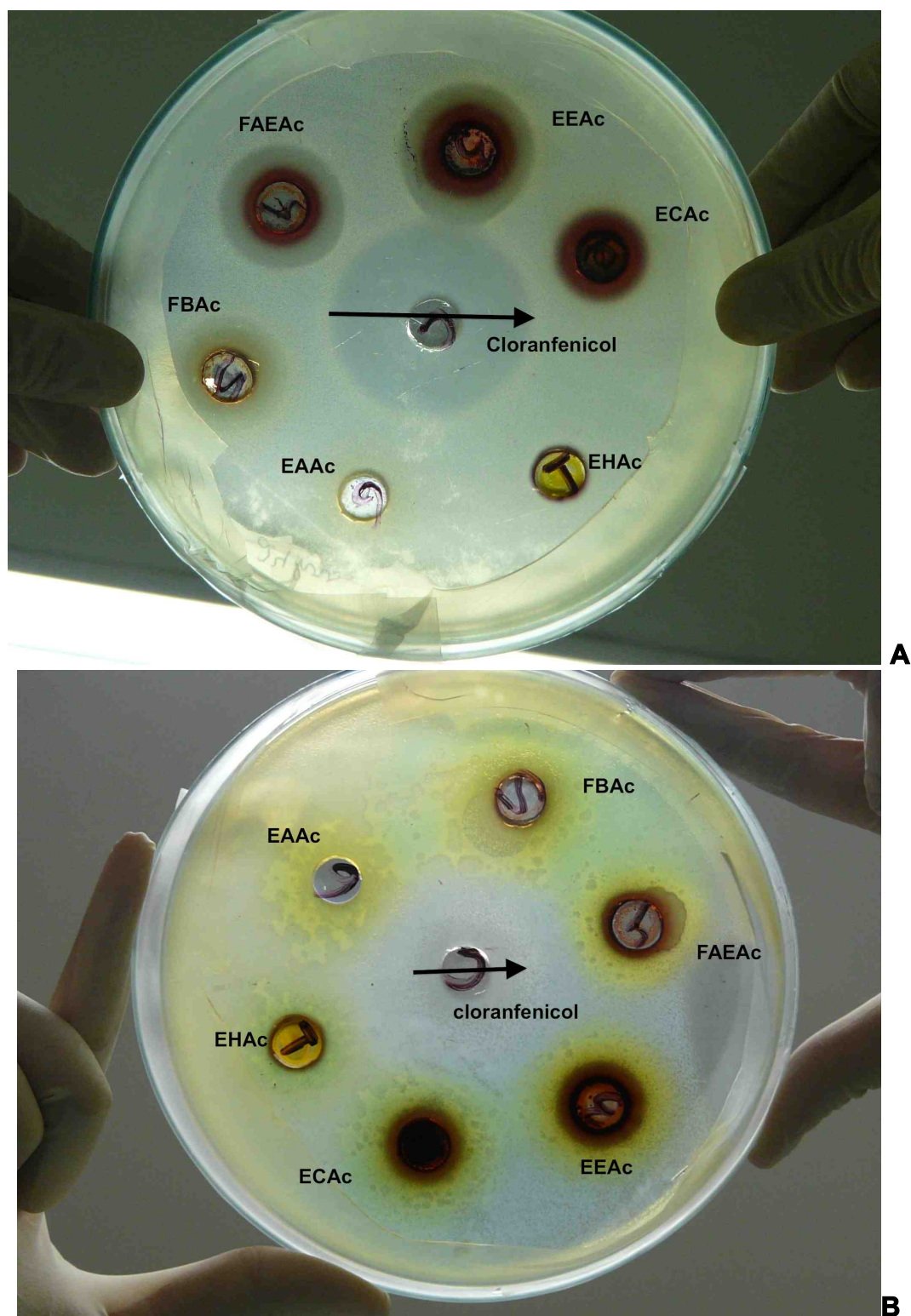


Figura 22. Teste de atividade antibacteriana utilizando o método de difusão em ágar (técnica do poço). Halos de inibição confirmando a ação antibacteriana dos extratos EC_{Ac} , EE_{Ac} , FAE_{Ac} e FB_{Ac} contra as bactérias: A- *Staphylococcus epidermidis* CBAM 293; e B- *Pseudomonas aeruginosa* CBAM 232.

Tabela 9. Atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *A. chica* obtida através do método de difusão em ágar.

Extratos/Frações (50 mg/mL)	TM	MC	CA	MP	SA	SE	PA	EC
Microrganismos								
EH_{Ac}	R	R	R	R	R	R	R	R
EC_{Ac}	R	+++ 17,1 16,2 20,1	R	R	+ 8,3 8,1 9,5	+++ 16,1 16,2 20,1	++ 11,2 15,3 15,2	+ 9,1 9,5 9,8
EE_{Ac}	R	+++ 17,5 17,8 16,1	R	R	+ 8,5 9,1 10,1	+++ 16,5 16,8 19,1	++ 11,1 11,5 12,1	+ 8,7 8,4 9,1
FAE_{Ac}	R	+++ 16,2 17,7 17,0	R	R	+ 8,2 8,5 8,9	+++ 17,3 16,6 19,3	++ 11,2 11,3 11,4	+ 8,7 8,8 9,1
FB_{Ac}	R	+++ 17,3 16,3 16,1	R	R	+ 8,3 9,2 9,1	+++ 16,2 16,7 17,6	++ 11,4 11,7 12,3	+ 8,9 8,3 9,2
EA_{Ac}	R	R	R	R	R	R	R	R
Cloranfenicol					++++ 20,1 20,3 20,5	++++ 20,2 21,1 23,3	++++ 20,3 20,9 21,2	++++ 23,4 23,5 22,2
Itraconazol	++++ 21,4 21,8 20,8	++++ 20,9 21,3 20,2	+++ 16,2 16,3 16,6	+++ 16,3 16,2 16,1				
CN	R	R	R	R	R	R	R	R

TM: *Trichophyton mentagrophytes* (CFAM 1288); MC: *Microsporium canis* (CFAM 1289); CA: *Candida albicans* (CFAM 1285); MP: *Malassezia pachydermatis* (CFAM 1290); SA: *Staphylococcus aureus* (CBAM 324); SE: *Staphylococcus epidermidis* (CBAM 293); PA: *Pseudomonas aeruginosa* (CBAM 232); EC: *Escherichia coli* (CBAM 002).

R: resistente; 8-11mm: +; 11,1-16mm: ++; 16,1-20mm: +++; 20,1-26mm: ++++; CN: controle negativo, água e etanol. Os números indicam os halos de inibição obtidos nas triplicatas realizadas com cada microorganismo.

As Figuras 23 a 27 mostram a representação gráfica dos resultados em halos de inibição (média $\pm$ desvio padrão) obtidos com cada extrato testado frente aos microrganismos no teste de difusão em ágar apresentados na Tabela 9. Nota-se que os extratos EC_{Ac}, EE_{Ac}, FAE_{Ac} e FB_{Ac} apresentaram halos de inibição significativos e maiores que 8 mm contra o fungo *Microsporium canis*, as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Os maiores halos de inibição foram contra o fungo *Microsporium canis* e contra a bactéria *Staphylococcus epidermidis*. Os testes realizados com o fungo *Trichophyton mentagrophytes*, com as leveduras *Candida albicans* e *Malassezia pachydermatis* não apresentaram halos de inibição.

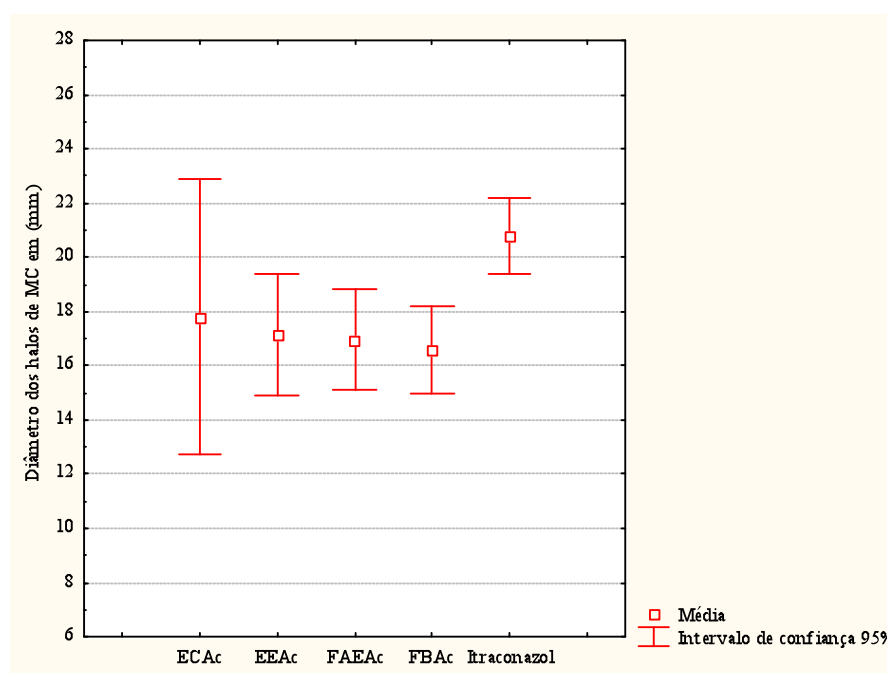


Figura 23. Atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *A. chica* obtida através do método de difusão em ágar contra o fungo *Microsporium canis*. No gráfico a abcissa mostra a referência dos extratos e frações (EC_{Ac}, EE_{Ac}, FAE_{Ac} e FB_{Ac} – na concentração comum de 50 mg/mL); enquanto a ordenada mostra os valores dos halos de inibição (mm). Valores obtidos através da média e desvio padrão, usando intervalo de confiança de 95%.

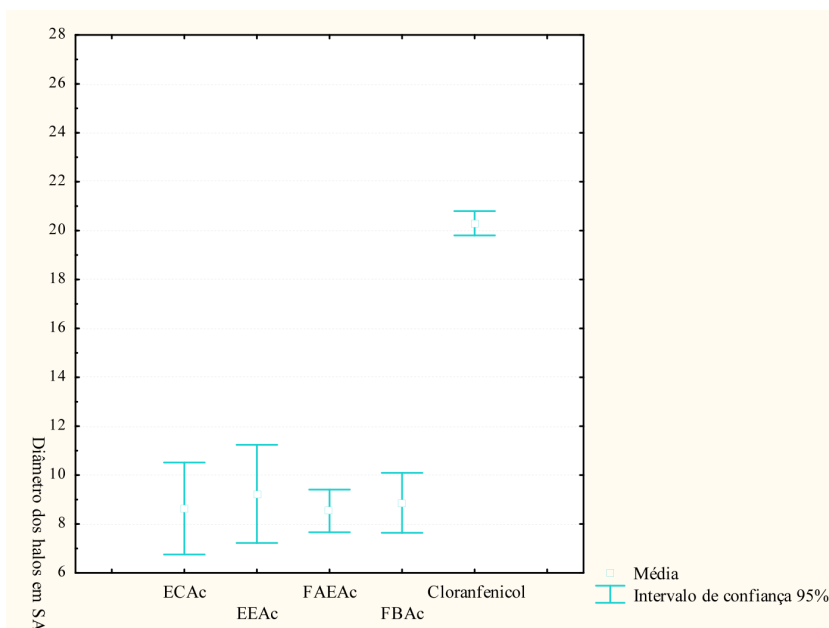


Figura 24. Atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *A. chica* obtida através do método de difusão em ágar contra a bactéria *Staphylococcus aureus*. No gráfico a abcissa mostra a referência dos extratos e frações (EC_{AC} , EE_{AC} , FAE_{AC} e FB_{AC} – na concentração comum de 50 mg/mL); enquanto a ordenada mostra os valores dos halos de inibição (mm). Valores obtidos através da média e desvio padrão, usando intervalo de confiança de 95%.

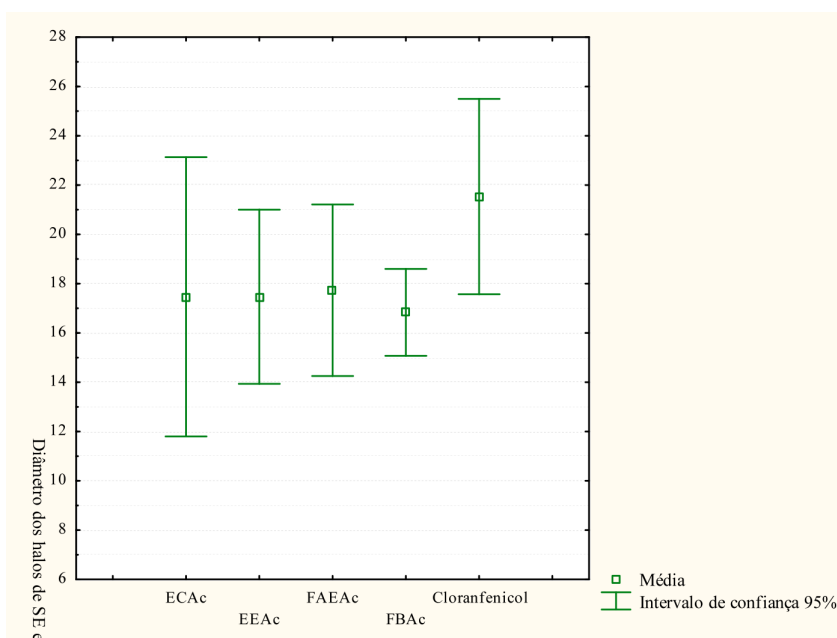


Figura 25. Atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *A. chica* obtida através do método de difusão em ágar contra a bactéria *Staphylococcus epidermidis*. No gráfico a abcissa mostra a referência dos extratos e frações (EC_{AC} , EE_{AC} , FAE_{AC} e FB_{AC} – na concentração comum de 50 mg/mL); enquanto a ordenada mostra os valores dos halos de inibição (mm). Valores obtidos através da média e desvio padrão, usando intervalo de confiança de 95%.

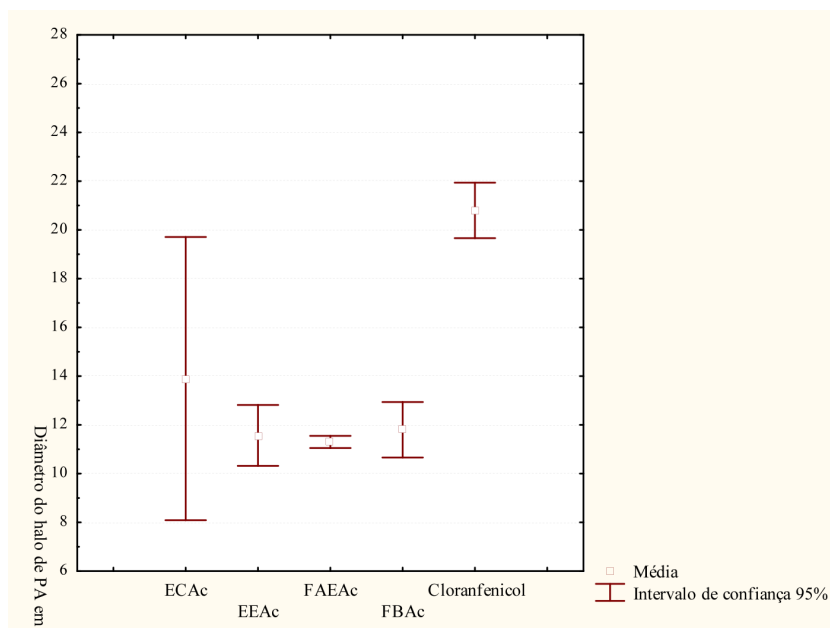


Figura 26. Atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *A. chica* obtida através do método de difusão em ágar contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. No gráfico a abcissa mostra a referência dos extratos e frações (EC_{AC}, EE_{AC}, FAE_{AC} e FB_{AC} – na concentração comum de 50 mg/mL); enquanto a ordenada mostra os valores dos halos de inibição (mm). Valores obtidos através da média e desvio padrão, usando intervalo de confiança de 95%.

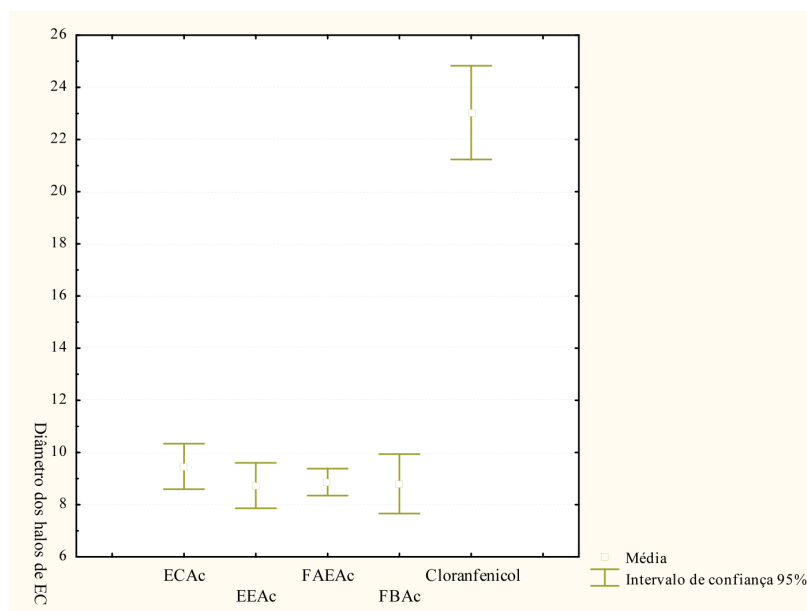


Figura 27. Atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *A. chica* obtida através do método de difusão em ágar contra a bactéria *Escherichia coli*. No gráfico a abcissa mostra a referência dos extratos e frações (EC_{AC}, EE_{AC}, FAE_{AC} e FB_{AC} – na concentração comum de 50 mg/mL); enquanto a ordenada mostra os valores dos halos de inibição (mm). Valores obtidos através da média e desvio padrão, usando intervalo de confiança de 95%.

6.2.2 Testes antimicrobianos dos extratos e frações de *A. chica* avaliadas com bioautografia

O teste de bioautografia foi realizado para determinar as possíveis manchas em cromatografia de camada delgada com atividade antimicrobiana (Quadro 3). O teste contra a bactéria *Staphylococcus epidermidis* mostrou atividade para as frações FAE_{Ac} , FB_{Ac} (R_f de 0,73; 0,68; e 0,62) e para controle positivo Itrazonazol (R_f de 0,61) (Figura 28).

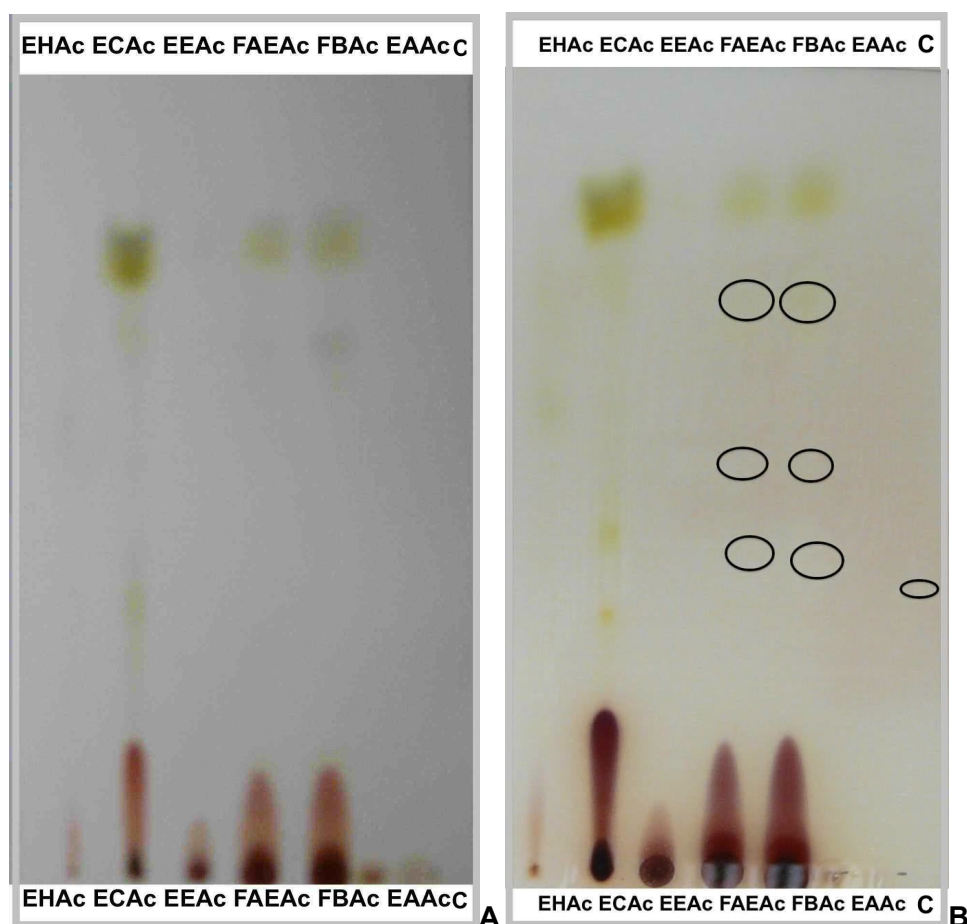


Figura 28. Bioautografia dos extratos (EH_{Ac} ; EC_{Ac} ; EE_{Ac} ; FAE_{Ac} ; FB_{Ac} ; EA_{Ac}) da *A. chica*. Sistema de eluição D (CA1). A- Placa controle (sem inclusão de bactérias); B – com *Staphylococcus epidermidis*, notar halos de inibição nas frações FAE_{Ac} e FB_{Ac} : $R_f=0,73$; $R_f=0,68$; e $R_f=0,62$; notar ausência de halo de inibição nos extratos EH_{Ac} , EC_{Ac} , EE_{Ac} . O controle positivo cloranfenicol (C) mostrou halo de inibição com $R_f=0,58$.

Os testes de bioautografia contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* mostraram halo de inibição para o extrato EC_{Ac} com Rf de 0,59 coincidente nos dois testes. O controle positivo (cloranfenicol) apresentou Rf=0,45 (Figura 29).

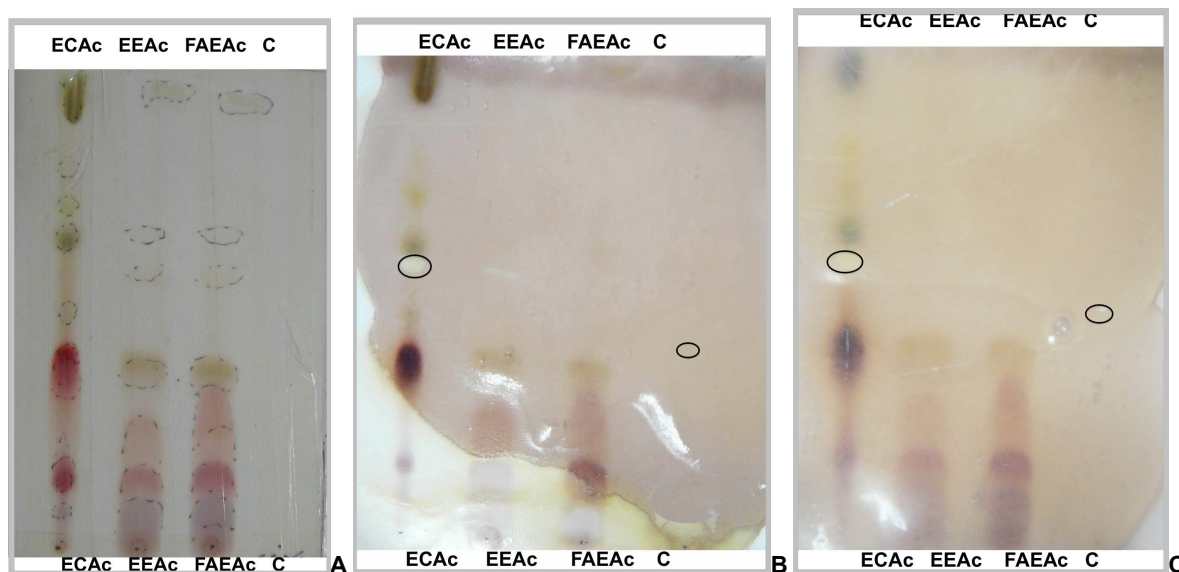


Figura 29. Bioautografia dos extratos (EH_{Ac}; EC_{Ac}; EE_{Ac}; FAE_{Ac}; FB_{Ac}; EA_{Ac}) obtidos da planta *A. chica*. Sistema de eluição C (CAAF). A – Placa controle (sem inclusão de bactérias); B - *Pseudomonas aeruginosa*, notar halo de inibição no extrato EC_{Ac}: Rf=0,59; C - *Escherichia coli*, notar halo de inibição no extrato EC_{Ac}: Rf=0,59. Controle positivo cloranfenicol (C): Rf=0,45.

O teste de bioautografia foi positivo para o extrato EC_{Ac} mostrando halos de inibição com Rf=0,4; Rf=0,5; e Rf=0,61 e na fração FAE_{Ac} halos de inibição com Rf=0,11 contra a *Malassezia pachydermatis* (Figura 30). O controle positivo itraconazol teve halo de inibição com Rf=0,89.

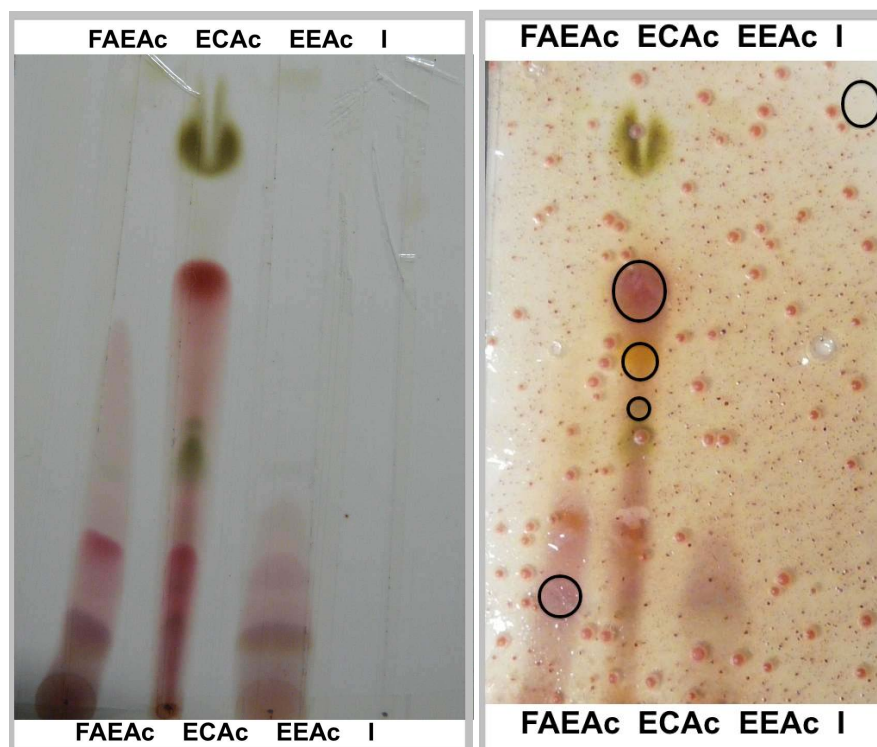


Figura 30. Bioautografia dos extratos (EH_{Ac} ; EC_{Ac} ; EE_{Ac} ; FAE_{Ac} ; FB_{Ac} ; EA_{Ac}) obtidos da planta *A. chica*. Sistema de eluição G (CM). A- Placa controle (sem inclusão de leveduras); B - *Malassezia pachydermatis*, notar halos de inibição nas frações FAE_{Ac} : $Rf=0,11$, e extratos EC_{Ac} : $Rf=0,4$; $Rf=0,5$ e $Rf=0,61$. O extrato EE_{Ac} não mostrou halos de inibição. Controle negativo itraconazol (I) com $Rf=0,89$.

6.2.3. Bioautografia de frações de *A. chica* obtidas em cromatografia em coluna de sílica gel

Após confirmação inicial da atividade antimicrobiana dos extratos e frações da *A. chica* (Quadro 3), aquelas com melhor atividade foram escolhidas para o fracionamento em coluna cromatográfica. Os melhores resultados no teste de bioautografia de sub-frações obtidas do fracionamento em coluna cromatográfica da amostra FAE_{Ac} , foram a sub-fração E4 (sub-frações reunidas de nº 61 a 66) e a sub-fração E5 (frações reunidas de nº 59 e 60).

Os melhores resultados de bioautografia foram com as frações obtidas através de coluna cromatográfica do extrato EC_{Ac} , que separou a fração Ac1 (frações

reunidas de n° 15 a 18); a fração Ac3 (fração n° 2); a fração Ac5 (frações reunidas de n° 35 a 40); a fração Ac7 (frações reunidas de n° 58 a 69).

As novas frações obtidas foram testadas contra a bactéria *Staphylococcus epidermidis*, demonstrada no teste de bioautografia na Figura 31. A Fração FAE_{Ac} apresentou atividade nos $R_f=0,68$ e $R_f=0,82$, a amostra Ac4 no $R_f=0,82$, a amostra Ac5 no $R_f=0,82$, a amostra do EC_{Ac} nos $R_f=0,56$, $R_f=0,69$ e $R_f=0,81$, na amostra Ac1 nos $R_f=0,69$ e $R_f=0,82$, na amostra Ac3 nos $R_f=0,69$ e $R_f=0,82$, na amostra Ac5 no $R_f=0,82$, na amostra Ac7 no $R_f=0,82$, enquanto o cloranfenicol usado como controle positivo, apresentou halo de inibição no ponto de aplicação na placa.

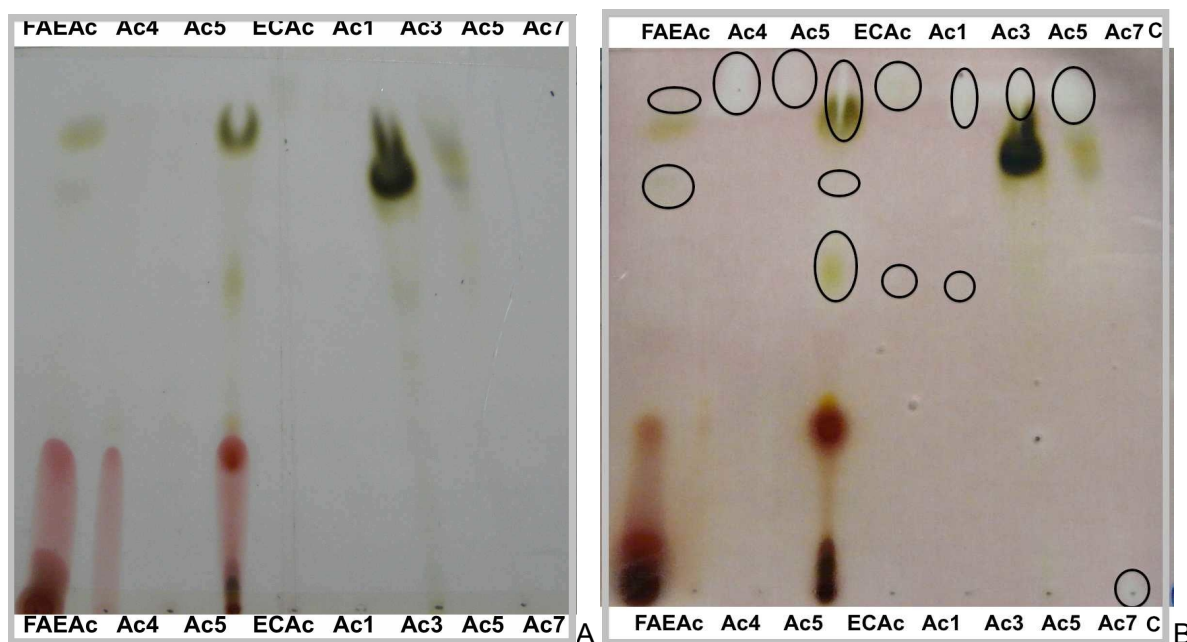


Figura 31. Bioautografia das frações de *A. chica* obtidas através de coluna de sílica gel. A- Placa controle (sem inclusão de bactérias); B- com *Staphylococcus sp.*, notar halos de inibição nas subfrações de FAE_{Ac} : E4 = frações n° 61 a 66; E5 = frações n° 59 e 60; nas frações de EC_{Ac} : Ac1 = Frações n° 15 a 18; Ac3 = fração n° 2; Ac5 = frações n° 35 a 40; Ac7 = frações n° 58 a 69. FA_{Ac} : $R_f=0,68$ e $0,82$, E4: $R_f=0,82$, E5: $R_f=0,82$, EC_{Ac} : $R_f=0,56$, $0,69$ e $0,81$, Ac1: $R_f=0,69$ e $0,82$, Ac3: $R_f=0,69$ e $0,82$, Ac5: $R_f=0,82$, Ac7: $R_f=0,82$. Controle positivo cloranfenicol (C): halo de inibição no ponto de aplicação.

Quadro 3. Resultados do teste de bioautografia com frações do extrato da planta *Arrabidaea chica*.

Extrato	Fase móvel	Atividade antibacteriana				Atividade antifúngica			
		SE	PA	SA	EC	CA	MP	MC	TM
EH _{Ac}	1	-	-	+	+	-	-	-	-
	2	-	-	+	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	-	-	+	-	-
	4	-	-	+	+	-	-	-	-
EC _{Ac}	1	-	-	+	+	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	+	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	-	+	-	-	-	-
EE _{Ac}	1	-	-	+	-	-	-	-	-
	2	-	+	+	-	-	+	-	-
	3	-	+	-	+	-	-	-	-
	4	-	-	-	+	-	-	-	-
FAE _{Ac}	1	-	-	+	-	-	-	-	-
	2	-	+	+	-	-	+	-	-
	3	-	+	-	+	-	-	-	-
	4	+	-	-	+	-	-	-	-
FB _{Ac}	1	-	+	+	-	-	-	-	-
	2	-	+	+	-	-	+	-	-
	3	-	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	-	+	+	-	-	-	-
EA _{Ac}	1	-	-	+	-	-	-	-	-
	2	-	-	+	-	-	+	-	-
	3	-	-	+	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	+	-	-	-	-

SE: *Staphylococcus epidermitis* (CBAM 293); PA: *Pseudomonas aeruginosa* (CBAM 232); SA: *Staphylococcus aureus* (CBAM 324); EC: *Escherichia coli* (CBAM 002); CA: *Candida albicans* (CFAM 1285); MP: *Malassezia pachydermatis* (CFAM 1290); MC: *Microsporum canis* (CFAM 1289); TM: *Trichophyton mentagrophytes* (CFAM 1288).

(+) para testes que tiveram pontos antimicrobianos ativos na cromatografia (TLC); (-) para testes que não tiveram pontos antimicrobianos ativos.

Sistemas de eluição: 1- ácido trifluoacético 2% : metanol (10:90); 2 – clorofórmio : acetona : ácido fórmico (7,5:1,6:0,8); 3 – ácido acético glacial : ácido clorídrico : água (1,5:0,3:8,2); e 4 – clorofórmio : acetato de etila (4:1).

6.2.4 Caracterização das substâncias antimicrobianas

Com os resultados dos testes de bioautografia, nova separação dos constituintes químicos das frações foi obtida em cromatografia em camada delgada preparativa. As frações purificadas foram submetidas aos testes de concentração inibitória mínima (CIM), concentração fungicida mínima (CFM) e concentração bactericida mínima (CBM) contra as leveduras *Candida albicans* e *Malassezia pachydermatis*; contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

As placas mostradas nas figuras 32 a 37 são os testes em placas de 96 poços para se determinar a concentração inibitória mínima. Testes preliminares foram realizados com todas as frações purificadas, comparando-se os fatores de retenção (Rf) com as atividade observadas nos testes de bioautografia. Os melhores resultados comprovados em triplicata foram com as frações purificadas Ac12F1, Ac12E e Ac9B1 (Tabela 10 e 11). Os testes foram realizados em triplicata.

Tabela 10. Concentração inibitória mínima de frações purificadas de *A. chica* contra bactérias patogênicas.

Frações/ compostos ativos	Concentração inibitória mínima (µg/mL)			
	Bactérias			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ac12F1	6,2	12,5	12,5	1,5
Ac12E	6,2	12,5	12,5	3,1
Ac9B1	6,2	12,5	25	6,2

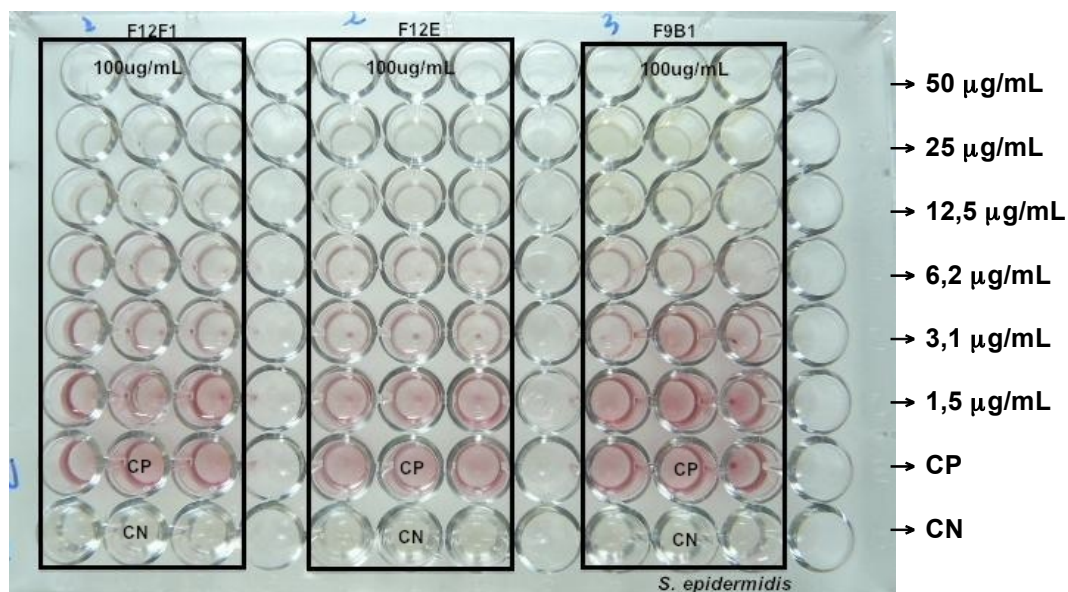


Figura 32. Teste em placa para determinação da concentração inibitória mínima utilizando frações purificadas (F12F1=Ac12F1, F12E=Ac12E e F9B1=Ac9B1) obtidas das folhas de *A. chica* contra *Staphylococcus epidermidis*. CN – controle negativo; CP – controle positivo. Notar que os pocinhos de coloração rósea mostram o crescimento do microrganismo (resistente as frações purificadas).

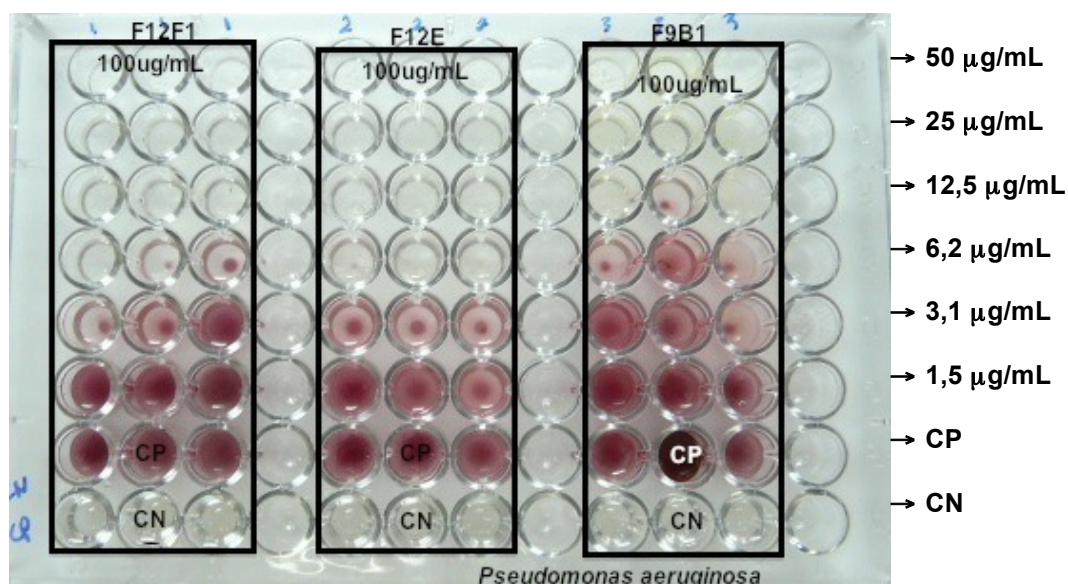


Figura 33. Teste em placa para determinação da concentração inibitória mínima utilizando frações purificadas (F12F1=Ac12F1, F12E=Ac12E e F9B1=Ac9B1) obtidas das folhas de *A. chica* contra *Pseudomonas aeruginosa*. CN – controle negativo; CP – controle positivo. Notar que os pocinhos de coloração rósea mostram o crescimento do microrganismo (resistente as frações purificadas).

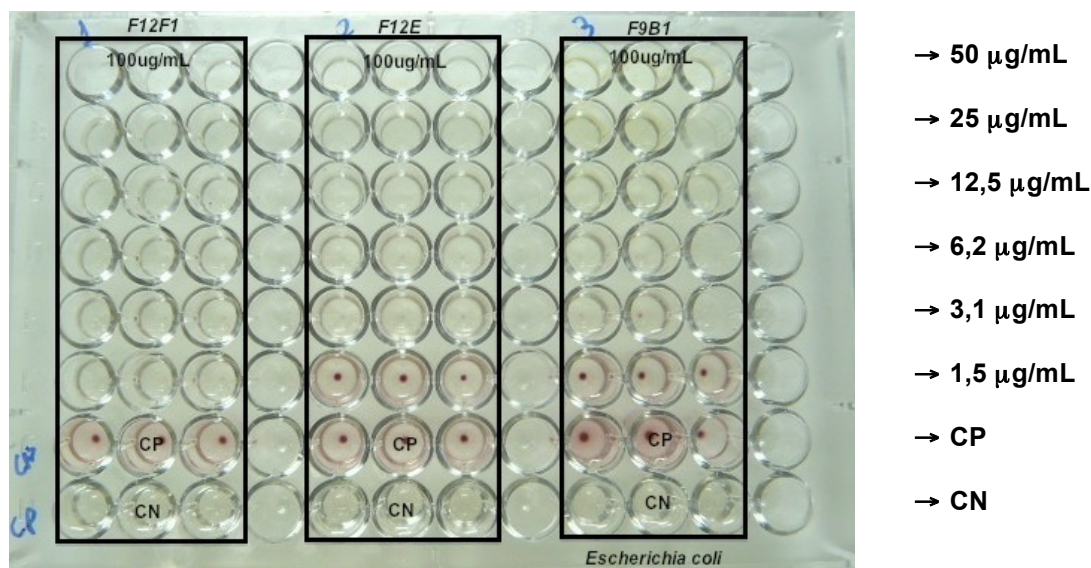


Figura 34. Teste em placa para determinação da concentração inibitória mínima utilizando frações purificadas (F12F1=Ac12F1, F12E=Ac12E e F9B1=Ac9B1) obtidas das folhas de *A. chica* contra *Escherichia coli*. CN – controle negativo; CP – controle positivo. Notar que os pocinhos de coloração rósea mostram o crescimento do microrganismo (resistente as frações purificadas).

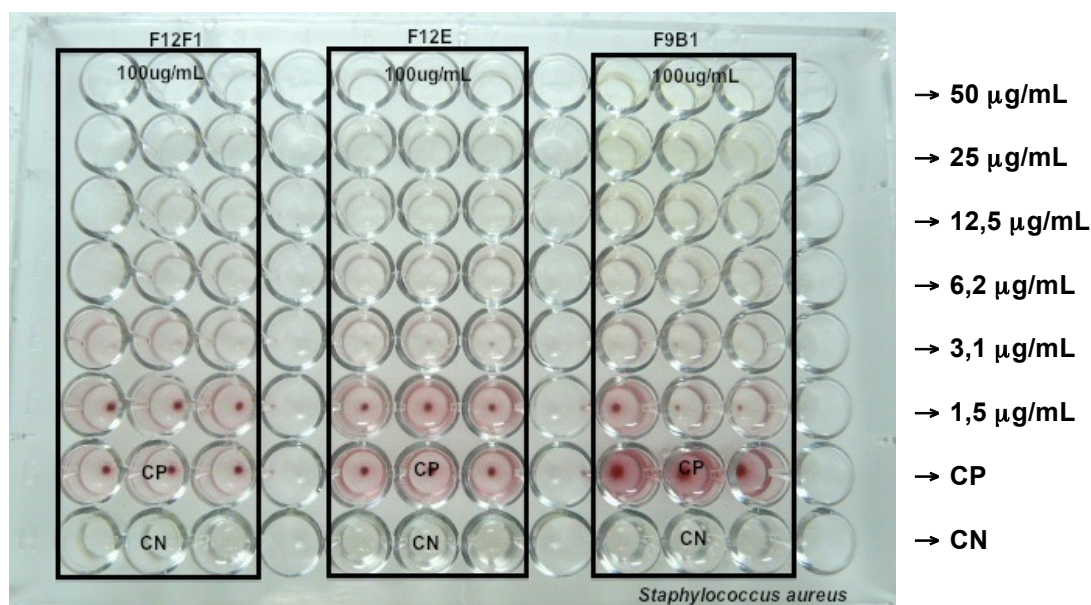


Figura 35. Teste em placa para determinação da concentração inibitória mínima utilizando frações purificadas (F12F1=Ac12F1, F12E=Ac12E e F9B1=Ac9B1) obtidas das folhas de *A. chica* contra *Staphylococcus aureus*. CN – controle negativo; CP – controle positivo. Notar que os pocinhos de coloração rósea mostram o crescimento do microrganismo (resistente as frações purificadas).

Tabela 11. Concentração inibitória mínima de frações purificadas de *A. chica* contra leveduras patogênicas.

Frações/Compostos Ativos	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$)	
	Leveduras	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Malassezia pachydermatis</i>
Ac12F1	50	6,2
Ac12E	25	6,2
Ac9B1	25	12,5

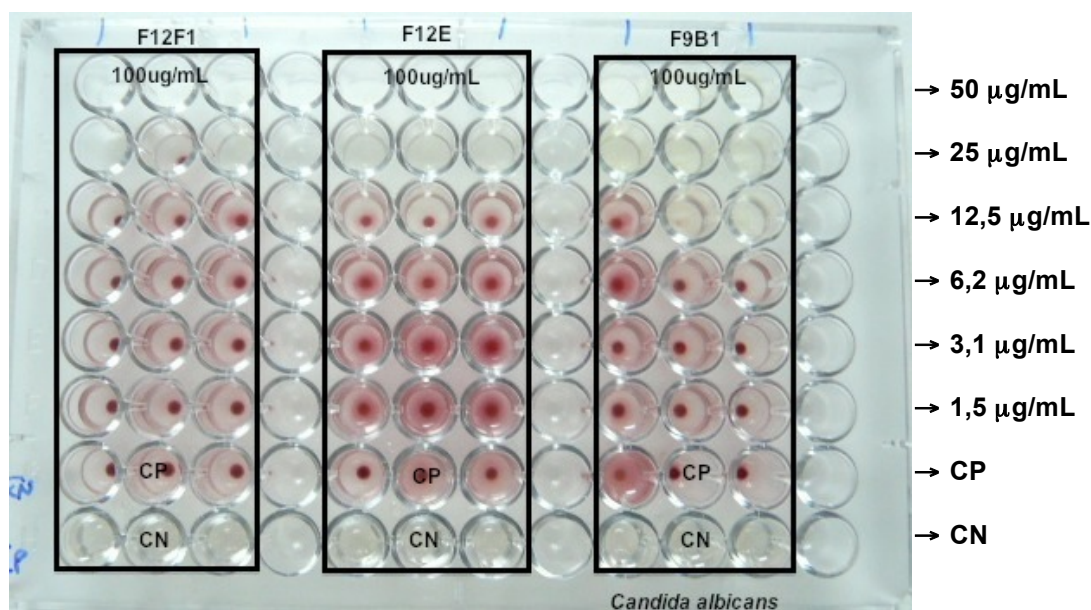


Figura 36. Teste em placa para determinação da concentração inibitória mínima utilizando frações purificadas (F12F1=Ac12F1, F12E=Ac12E e F9B1=Ac9B1) obtidas das folhas de *A. chica* contra *Candida albicans*. CN – controle negativo; CP – controle positivo. Notar que os pocinhos de coloração rósea mostram o crescimento do microrganismo (resistente as frações purificadas).

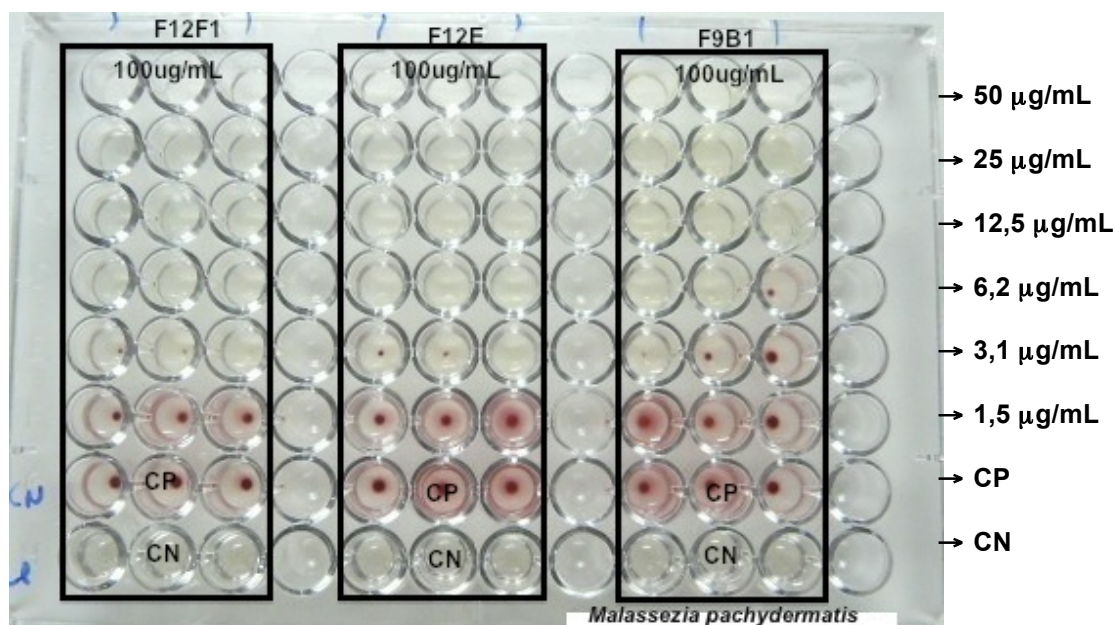


Figura 37. Teste em placa para determinação da concentração inibitória mínima utilizando frações purificadas (F12F1=Ac12F1, F12E=Ac12E e F9B1=Ac9B1) obtidas das folhas de *A. chica* contra *Malassezia pachydermatis*. CN – controle negativo; CP – controle positivo. Notar que os pocinhos de coloração rósea mostram o crescimento do microrganismo (resistente às frações purificadas).

O teste de concentração bactericida mínima analisou as mesmas frações purificadas utilizadas na CIM. Para a interpretação dos resultados foi considerado que, a inibição no ensaio da CIM e crescimento do microrganismo na subcultura (CFM e CBM) indicava ação fungistática ou bacteriostática, e a ausência de crescimento na subcultura indicava ação fungicida ou bactericida, respectivamente (BARON e FINEGOLD, 1990). Os resultados foram concordantes com aqueles apresentados nos testes de concentração inibitória mínima, indicando a presença de substâncias com ação fungicida ou bactericida (Tabela 12 e 13).

Tabela 12. Concentração bactericida mínima de frações purificadas de *A. chica* contra bactérias patogênicas.

Frações/Compostos Ativos	Concentração bactericida mínima (µg/mL)			
	Bactérias			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ac12F1	6,2	12,5	12,5	1,5
Ac12E	6,2	12,5	12,5	3,1
Ac9B1	6,2	12,5	25	6,2

Tabela 13. Concentração fungicida mínima de frações purificadas de *A. chica* contra leveduras patogênicas.

Frações/Compostos Ativos	Concentração inibitória mínima (µg/mL)	
	Leveduras	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Malassezia pachydermatis</i>
Ac12F1	50	6,2
Ac12E	25	6,2
Ac9B1	25	12,5

As placas semeadas com o conteúdo dos pocinhos nos quais a atividade antimicrobiana havia sido confirmada através da CIM, estão ilustradas na Figura 38A que mostra a placa sem crescimento de microrganismos, isto é, resultado indicativo de ação fungicida; a Figura 38B mostra o crescimento de microrganismos na placa, sendo indicativa de ação fungistática.

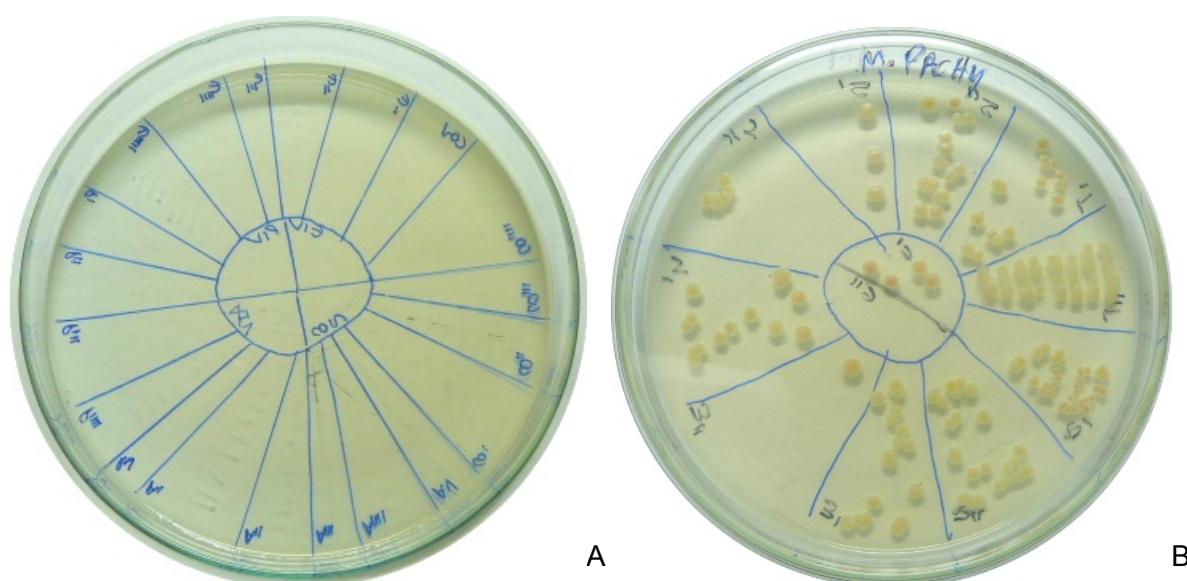


Figura 38. Placas utilizadas no teste para determinação da concentração fungicida mínima de frações purificadas contra *Malassezia pachydermatis*. A- Placa demonstrando concentrações com atividade fungicida; B- Placa demonstrando crescimento da levedura em amostras que demonstraram crescimento na CIM.

6.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)

As frações Ac12F1, Ac9B1 e Ac12E foram analisadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (Shimadzu – Japão). A fase móvel consistiu de gradiente linear de água/metanol 15 a 95% durante 30 min, em coluna analítica Shimpack VP-ODS (150 x 2.0 mm) empacotada com partículas esféricas de 5 µm, eluída com fluxo constante de 0,2 mL/min. As amostras foram dissolvidas em água/metanol 15%, filtradas em filtro de 0,22 µm (Millipore – USA) e injetadas no cromatógrafo em alíquotas de 10 µL.

A análise da fração Ac12F1 por LC-MS (Figura 39 e 40) mostrou picos com tempos de retenção: 1,8; 4,7; 8,4; 16,9; 20,1; 26,2 e 26,7 min.

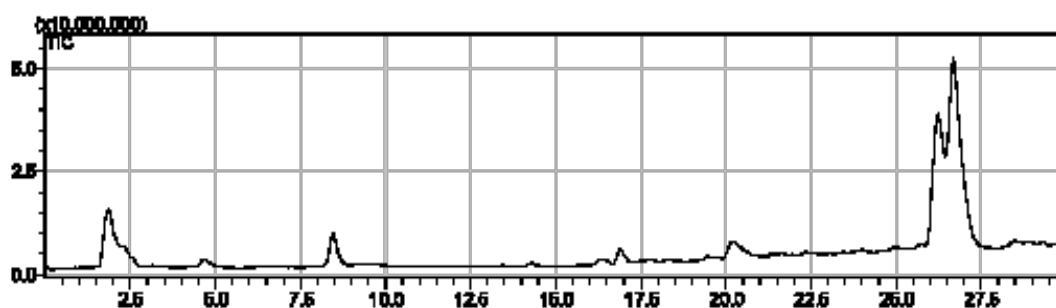


Figura 39. Perfil cromatográfico da fração Ac12F1 de *Arrabidaea chica* em LC-MS utilizando coluna C18, gradiente linear de água/metanol de 15 a 95% em 30 min e fluxo de 0,2 mL/min.

Os espectros dos compostos correspondentes aos picos majoritários da fração purificada Ac12F1 são mostrados a seguir na Figura 40:

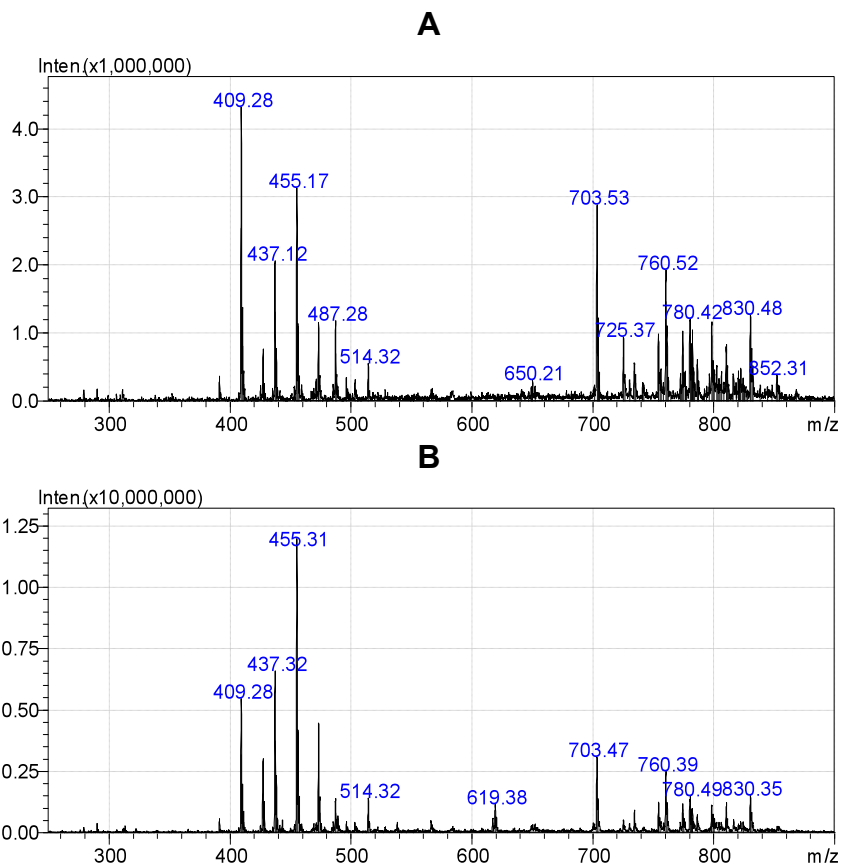


Figura 40. Espectros de massas dos picos majoritários da fração purificada Ac12F1 da *A. chica*. **A**: espectro do pico com tempo de retenção de 26,2 min. **B**: espectro do pico com tempo de retenção de 26,7 min.

A análise da fração Ac9B1 por LC-MS (Figura 41 e 42) mostrou picos com tempos de retenção: 1,9; 4,5; 6,6; 8,3; 10,0; 17,2; 19,0; 21,5; 23,8; 25,7; 27,0 e 27,7 min.

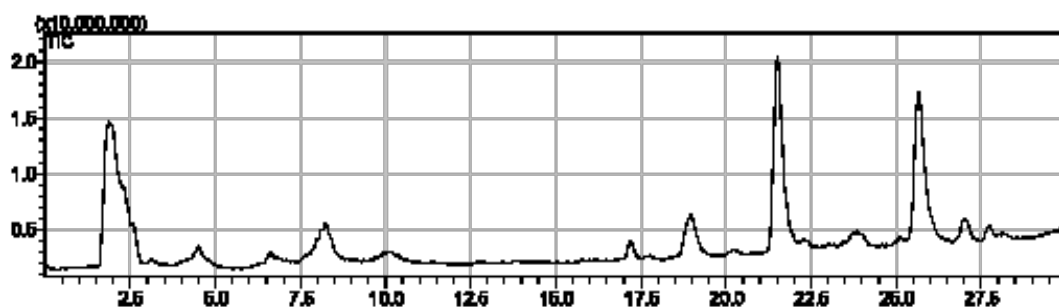


Figura 41. Perfil cromatográfico da fração Ac9B1 de *Arrabidaea chica* em LC-MS utilizando coluna C18, gradiente linear de água/metanol de 15 a 95% em 30 min e fluxo de 0,2 mL/min.

Os espectros dos compostos correspondentes aos picos majoritários da fração Ac9B1 são mostrados a seguir:

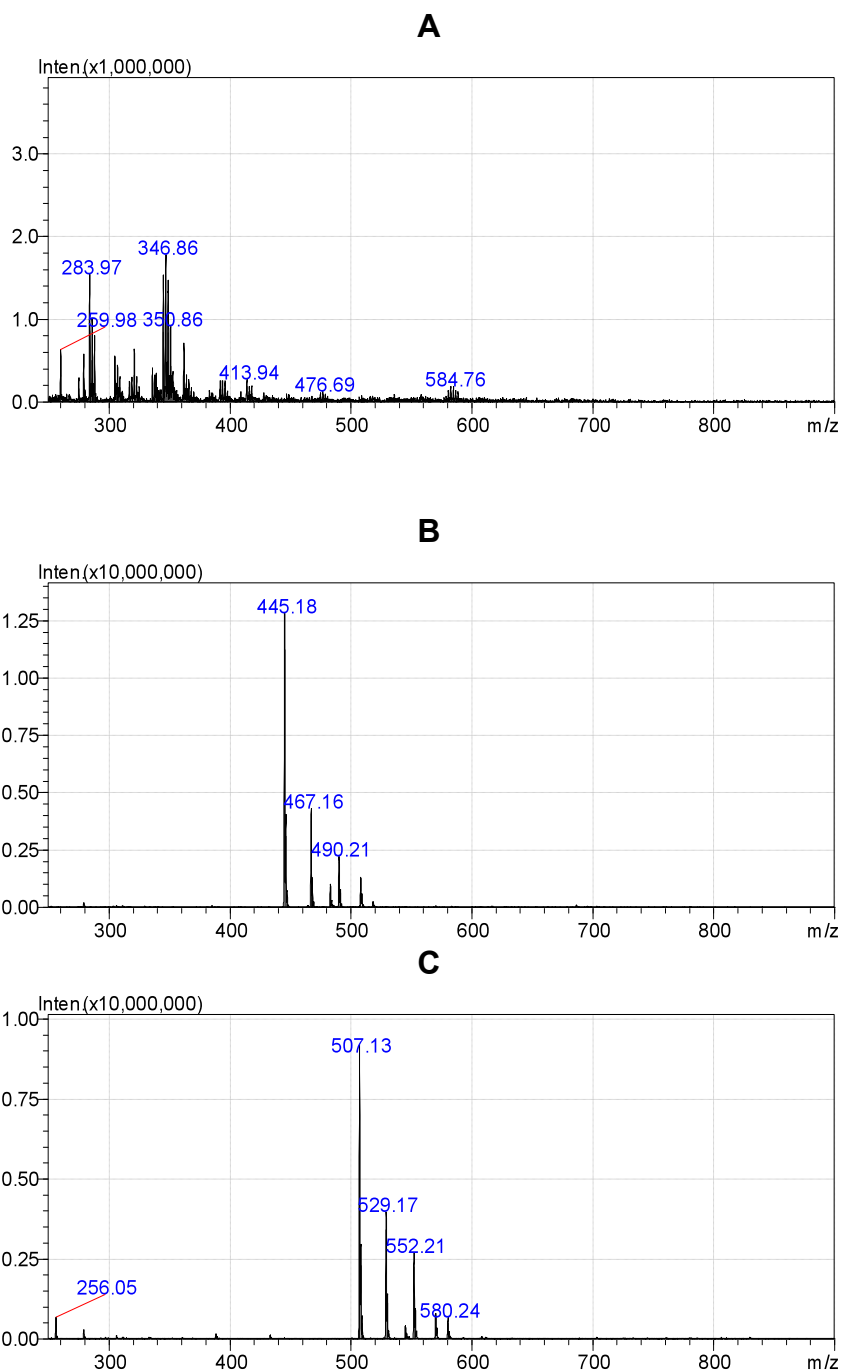


Figura 42. Espectros de massas dos picos majoritários da fração F1. **A**: espectro do pico com tempo de retenção de 1,9 min. **B**: espectro do pico com tempo de retenção de 27,0 min. **C**: espectro do pico com tempo de retenção de 27,7 min.

A análise da fração Ac12E por LC-MS (Figura 43 e 44) mostrou picos com tempos de retenção: 2,0 e 13,6 min.

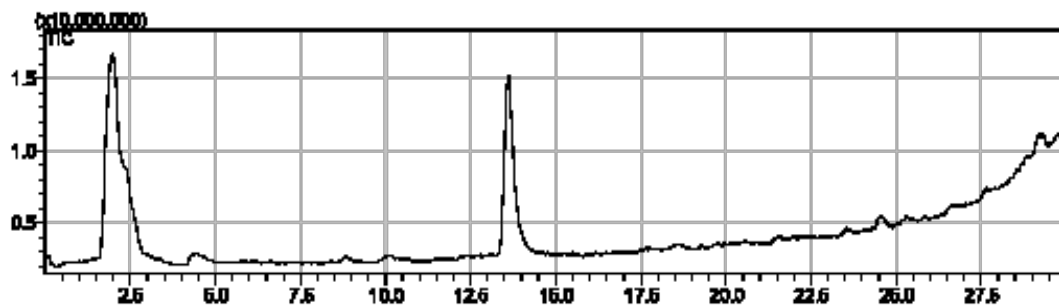


Figura 43. Perfil cromatográfico da fração Ac12E de *Arrabidaea chica* em LC-MS utilizando coluna C18, gradiente linear de água/metanol de 15 a 95% em 30 min e fluxo de 0,2 mL/min.

Os espectros dos compostos correspondentes aos picos majoritários da fração Ac12E são mostrados a seguir:

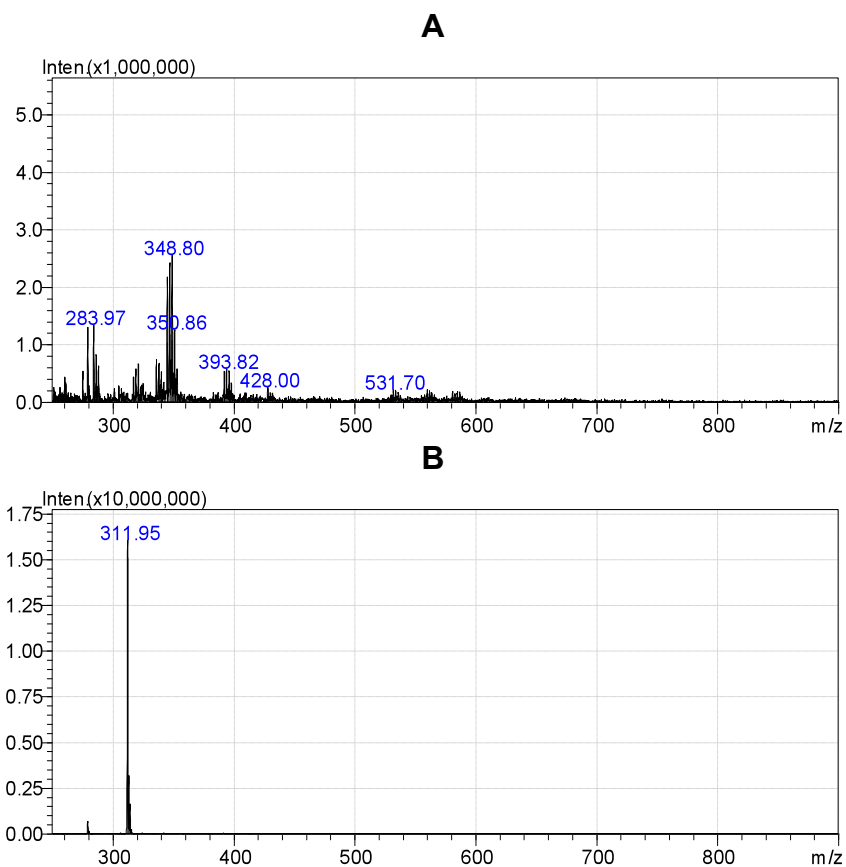
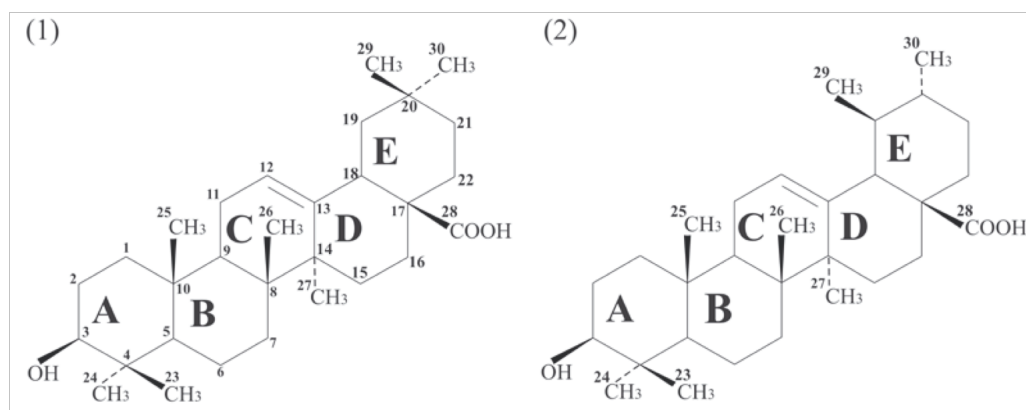


Figura 44. Espectros de massas dos picos majoritários da fração Ac12E de *A. chica*. **A**: espectro do pico com tempo de retenção de 2,0 min. **B**: espectro do pico com tempo de retenção de 13,6 min.

As frações purificadas Ac12F1, Ac12E e Ac9B1 foram submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), indicando seus constituintes em forma de misturas. Na análise de ressonância magnética nuclear de carbono da amostra Ac12F1, foram visualizados sinais em 125,6 e 122,4 ppm indicativos de carbono insaturado, em 79,6 e 65,9 ppm correspondendo ao carbono carbinólico (-C-O-H e/ou -C-O-), e em 14 a 55 ppm similares aos carbonos do esqueleto do triterpeno do tipo oleaneno (Figura 45), mostrando que se trata possivelmente de uma mistura de dois componentes (VECHIA et al., 2009; FATOPE et al., 2000), sendo um deles derivado de ácido oleanólico, corroborando com o cromatograma em camada delgada comparando o extrato com o padrão ácido oleanólico (Figura 19).



- ácido oleanólico (C30 H48 O3 PM 456.71)
 - ácido ursólico (C30 H48 O3 PM 456.68)

Figura 45. Estrutura química de derivados triterpênicos, (1) ácido oleanólico, (2) ácido ursólico (WOLSKA et al., 2010).

Na ressonância magnética nuclear de carbono da amostra Ac9B1, foram visualizados sinais em 144,3; 138,6; 128,7; 125,4; 122,2 ppm indicativos de carbono insaturado, em 83,7; 68,8 e 63,6 ppm correspondendo ao carbono carbinólico (-C-O-H e/ou -C-O-), e em 14 a 55 ppm similares aos carbonos do esqueleto do triterpeno do tipo oleaneno (Figura 18), tratando-se possivelmente de uma mistura de três substâncias, sendo duas delas em quantidades próximas.

7. DISCUSSÃO

As folhas da planta *A. chica* são utilizadas na medicina popular como anti-inflamatório e adstringente para tratamentos de doenças de pele, desinfecção das partes íntimas de mulheres, cólicas intestinais, diarreia com sangue, leucorréia, anemia e leucemia. Devido ao seu uso tradicional, pequenas empresas da Amazônia começaram a incorporar aqueles extratos em suas formulações cosméticas sem nenhuma indicação a ações terapêuticas. Por exemplo, extratos de cajuí foram introduzidos nessas formulações como protetores de maquiagem, como antioxidantes inibidores da formação de rugas, para melhorar a tonicidade da pele, ou, ainda, como agentes anti-inflamatórios (MARC et al., 2001).

Diferentemente desses usos, nossos estudos foram direcionados para demonstrar a atividade farmacológica dos extratos de cajuí, optando desde o início pela padronização da planta coletada de cultivos controlados, pela padronização do processo extrativo e pela padronização química dos extratos cuja atividade era pretendida. Mais ainda, os testes foram realizados utilizando microrganismos, fungos e bactérias, de coleções estabelecidas oficialmente na FIOCRUZ da Amazônia (CFAM e CBAM); os outros microrganismos utilizados nos testes foram isolados de animais amostrados em Clínica Veterinária da Cidade de Manaus, constituindo um material representativo da epidemiologia local das otites e dermatopatias da região. Mais ainda, os microrganismos utilizados em todos os testes biológicos foram previamente identificados. O diferencial da pesquisa relatada nesse trabalho de Tese foi, portanto, a garantia da qualidade do material utilizado, em obediência às Boas Práticas de Laboratório.

Tem-se conhecimento de um outro estudo acadêmico em que os extratos de craijirú avaliados em testes de suscetibilidade frente a uma gama de leveduras, fungos filamentosos e bactérias apresentaram diferentes capacidades de inibição de crescimento ou eliminação do microrganismo testado. O estudo serviu a um depósito de patente, e talvez por isso os detalhes da pesquisa são pouco esclarecedores (BARATA et al., 2006). As micoses não são doenças de notificação obrigatória e despertam pouco interesse em trabalhos associados e estudos epidemiológicos. Por isso, torna-se quase impossível obter informações exatas e recentes sobre a extensão dessas infecções no Brasil (LACAZ et al., 2002). Nesse sentido, o depósito de microrganismos em bancos oficiais de Microbiologia é uma necessidade, pois somente nas coleções, podem ser avaliadas as mudanças nos perfis fenotípicos e genotípicos das amostras que caracterizam a biodiversidade microbiana de uma determinada região (MULLER et al., 1985; ODDS, 1991; DOAN e DAVIDSON, 2000). Por isso, a coleta, a identificação, a preservação e o depósito de microrganismos na coleção de fungos da Amazônia pode vir a contribuir muito para estudos posteriores de prevalência clínica. Por outro lado, frente às influências do ecossistema na expressão gênica dos metabólitos secundários das plantas, é necessário que os extratos testados por sua atividade farmacológica sejam quimicamente padronizados (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Os dois métodos mais comumente utilizados para a triagem da atividade de extratos e frações purificadas de plantas com potencial bactericida e antifúngico são o de difusão em ágar e o de diluição em caldo. Os testes de difusão em ágar podem ser realizados através das técnicas do disco, do poço ou “template”. Estudos comprovaram que a difusão em ágar pela técnica do poço é mais fácil, dá resultados mais constantes e tem custo menor, quando comparada às demais técnicas. Essas

vantagens justificam seu uso na triagem inicial de extratos com atividade antimicrobiana (ALVES et al., 2008).

O método de difusão em ágar consiste na semeadura em meio de cultura sólido, geralmente ágar Mueller-Hinton para bactérias e ágar Sabouraud para fungos e leveduras. No ágar sólido semeado com o microrganismo, discos de papel impregnados com o extrato, ou com as frações que serão testadas, podem ser posicionados, medindo-se a inibição do crescimento ao seu redor. A variante deste método, com dispensação direta dos extratos em poços feitos no ágar estéril foi utilizada neste trabalho. Segundo VALGAS (2002), o método com poços, dá melhores resultados, porque o gradiente constante de concentração dos produtos permite a difusão radial rápida em trajetória horizontal, podendo alcançar distâncias maiores no mesmo intervalo de tempo necessário no método de disco. No entanto, a técnica de difusão em ágar permite avaliar qualitativamente a presença de atividade antimicrobiana, se os extratos difundirem do poço para o ágar, pois, caso contrário, não ocorrerá à formação de halo de inibição. Como o halo também é indicativo da capacidade de difusão dos extratos, o teste considera como resultados positivos os halos maiores ou iguais a 8 mm sobre qualquer microrganismo testado.

Com esse critério, no presente trabalho os extratos EH_{Ac} e EA_{Ac} em testes de difusão em ágar foram negativos, enquanto os extratos EC_{Ac}, EE_{Ac}, as frações FAE_{Ac} e FB_{Ac} apresentaram halos de inibição significativos. O teste de difusão em ágar tem melhores resultados com substâncias polares, que difundem melhor no meio salino (CHOMA e GRZELAK, 2011).

Os extratos EH_{Ac} e EA_{Ac} são apolares, o que provavelmente dificultou a difusão no meio de cultura, indicando, talvez de forma imprecisa, a resistência dos microorganismos aos extratos.

A efetividade da ação dos mesmos extratos e frações foi confirmada no teste de bioautografia que também direcionou o fracionamento genérico das amostras ativas.

A bioautografia é um teste comum que permite analisar atividades antimicrobianas de extratos de plantas com sensibilidade comparativamente maior que a de outros testes (CHOMA e GRZELAK, 2011). A escolha deste teste no nosso trabalho foi motivada pela necessidade de localizar na CCD os grupos de substâncias que possivelmente estariam envolvidos com a atividade antimicrobiana.

O teste de bioautografia confirmou a atividade contra as bactérias: *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, quando utilizamos o extrato EC_{Ac}, frações FAE_{Ac} e FB_{Ac}. Os extratos EH_{Ac} e EA_{Ac} inibiram as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O extrato EE_{Ac} mostrou halos de inibição contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Nos testes de bioautografia contra as leveduras e fungos filamentosos, a atividade antimicrobiana somente foi confirmada nos extratos EH_{Ac}, EC_{Ac}, EE_{Ac}, EA_{Ac}, e frações FAE_{Ac}, FB_{Ac} contra a *Malassezia pachydermatis* e a *Candida albicans*, enquanto o *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis* mostraram resistência à todos extratos e frações testados.

Após a definição dos R_f das manchas com halos de inibição na bioautografia, o extrato EC_{Ac} e a fração FAE_{Ac}, por apresentarem os melhores resultados, foram fracionados em coluna cromatográfica. Depois do fracionamento as amostra obtidas foram novamente submetidas aos testes de bioautografia.

Confirmando os resultados anteriores obtidos com os extratos mãe, as frações obtidas do extrato EC_{Ac} tiveram os melhores resultados nos testes de bioautografia.

As frações foram ativas contra as bactérias *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*; e contra a levedura *Malassezia pachydermatis*. Foram identificados os Rfs dos possíveis compostos ativos que mostraram halos de inibição.

As frações que apresentaram atividade antimicrobiana foram aplicadas em placas preparativas de cromatografia em camada delgada e as subfrações ativas foram obtidas por raspagem das placas. Estas subfrações foram submetidas a novos testes de bioautografia para confirmação da atividade antimicrobiana. A bioautografia foi positiva para as amostras Ac9B1, Ac12F1, Ac12E e Ac12C.

Em teste piloto, a CIM dessas subfrações identificou os melhores resultados com as amostras, Ac12F1, Ac12E e Ac9B1, que mostraram atividade antimicrobiana com CIM = 12,5 µg/mL contra *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, e CIM = 25 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Contra as leveduras, o CIM para a *Candida albicans* foi 50 µg/mL e para a *Malassezia pachydermatis* foi 25 µg/mL.

Oa testes definitivos de CIM realizados em triplicata com as subfrações, Ac12F1, Ac12E e Ac9B1 confirmaram e definiram as suscetibilidades com mais precisão:

- contra as bactérias *Staphylococcus epidermidis* a CIM foi de 12,5 µg/mL frente às três subfrações (Ac12F1, Ac12E e Ac9B1);
- contra *Staphylococcus aureus* a CIM foi de 6,2 µg/mL com as três subfrações;
- contra a *Escherichia coli* a CIM foi de 1,5 µg/mL com a subfração Ac12F1, 3,1 µg/mL com a subfração Ac12E e 6,2 µg/mL com a subfração Ac9B1;
- contra a *Pseudomonas aeruginosa* a CIM foi de 12,5 µg/mL frente as subfrações Ac12F1 e Ac12E, e 25 µg/mL com a subfração Ac9B1.

- contra as leveduras *Candida albicans* a CIM foi de 50 µg/mL com a subfração Ac12F1 e 25 µg/mL com as subfrações Ac12E e Ac9B1;

- contra a *Malassezia pachydermatis* a CIM foi de 6,2 µg/mL com as subfrações Ac12F1 e Ac12E, e 12,5 µg/mL com a subfração Ac9B1.

Os testes de concentração fungicida e bactericida mínima confirmaram os resultados apresentados no teste da CIM indicando a morte dos microrganismos na concentração inibitória mínima apresentada.

Segundo Alves et al., 2008, o método de diluição em caldo é a melhor opção para se determinar a atividade microbiana. A determinação da CIM é considerada a melhor ferramenta para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos. No entanto, os autores consideram que os métodos de diluição em caldo ou ágar são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um microrganismo específico (ALVES et al., 2008).

O teste de microdiluição permite avaliar a atividade antimicrobiana de extratos e frações purificadas de plantas em termos quantitativos, mas não existe consenso na literatura de qual valor de CIM deve ser considerado para qualificar um extrato, ou frações purificadas de planta, como fitoterápico promissor. Alguns autores consideram um extrato potente quando o valor de MIC é inferior a 1000 µg/mL, enquanto outros consideram CIM < 500 µg/mL (CARNEIRO et al., 2008; KOSINA et al., 2010; SHIKANGA et al., 2010; WECKESSER et al., 2007).

Deve-se considerar que a atividade antimicrobiana de substâncias puras está sujeita a um menor número de interferentes que a avaliação da atividade de amostras complexas, como são os extratos brutos de espécies vegetais. De fato, o conhecimento das características físico-químicas do agente antimicrobiano

(solubilidade, carga iônica e massa molecular), possibilita evidenciar possíveis interferências causadas por constituintes desconhecidos presentes nas amostras (ALVES et al., 2008).

Em nosso trabalho, a análise das subfrações ativas em LC-MS e RMN além de ter permitido direcionar os fracionamentos para isolar os compostos antimicrobianos de maior interesse (HOSTETTMANN et al., 1997) permitiram também a padronização dos fitoterápicos de *A. chica*, antes da purificação química, do isolamento e da identificação dos compostos. Nesse sentido, quando submetidas à ressonância magnética nuclear de carbono, as frações Ac12F1 e Ac9B1 mostraram tratar-se de análogos triterpênicos do tipo oleaneno. Esses triterpenos ainda não haviam sido descritos na planta *A. chica*.

Muitos terpenóides são descritos com ação antimicrobiana. ALCERITO et al. (2002) por exemplo, descreveram atividade antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum* nas folhas de *Arrabidaea brachypoda*, uma bignoneacea nativa e comum no cerrado brasileiro com terpenóides e flavonóides importantes para proteção da planta contra patógenos e contra radiação ultravioleta.

Os terpenóides são metabólitos secundários formados de unidades de isopreno com importância fitoquímica em óleos essenciais formados de misturas de mono e sesquiterpenóides. Demonstrou-se que os triterpenos pentacíclicos encontrados no óleo essencial de muitas famílias botânicas possuem atividade antimicrobiana (LIU, 1995) estimada em 60% contra fungos e 30% inibindo bactérias. O ácido oleanólico e ácido ursólico isolados a *A. chica* são triterpenos pentacíclicos (FATOPE, 2000; WOLSKA et al., 2010). Esses isoprenóides contendo 30 átomos de carbono estão presentes na alimentação humana e o consumo

abundante parece indicar sua baixa toxicidade. Como muitas plantas usadas na medicina tradicional e com potencial clínico bem estabelecido, contêm esses triterpenos, ou seus derivados, existe na literatura uma ampla abordagem farmacológica para esses dois triterpenos isômeros.

Na China, por exemplo, os compostos têm sido usados via oral em tratamento de doenças hepáticas humanas (LIU, 1995). Atividades anti-inflamatória, analgésica, cardiotônica, antiulcerativa, hepatoprotetora, contra diabetes, fungicida e parasiticida foram descritas (LI et al., 2003; NISHINO et al., 1988; UDAYAMA et al., 1998; ORTIZ-ANDRADE et al., 2007; BECKER et al., 2005; CUNHA et al., 2003; VECHIA et al., 2009).

A atividade antimicrobiana / antiviral também é muito citada, mas às vezes os resultados são controversos (MENGONI et al., 2002). Por exemplo, ação antibacteriana contra *Staphylococcus epidermidis* foi descrita para os ácidos oleanólico e ursólico isolados de *Salvia officinalis* (SALEEM et al., 2010); o ácido ursólico teve a MIC de $8 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Em estudo recente o ácido oleanólico isolado da *Calendula officinalis* (Asteraceae) teve um efeito antimicrobiano frente a muitas espécies de bactérias, especialmente a *Staphylococcus epidermidis*, mas também contra *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (SZAKIEL et al, 2008). Contrapondo-se a esses resultados, o ácido oleanólico extraído de *Caesalpinia paraguarensis* (Fabaceae) teve atividade moderada contra *S. aureus* com a CIM de $64 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto o ácido oleanólico isolado de *Syzygium guineense* (Myrtaceae) não inibiu o crescimento bacteriano da *Escherichia coli*. O ácido oleanólico obtido do extrato de *Geum rivale* (Rosaceae) não inibiu o crescimento das bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*; já o ácido oleanólico

obtido do isolamento da planta *Cyclamen mirabile* (Primulaceae) inibiu o crescimento da bactéria *S. aureus*, da *P. aeruginosa* e da *E. coli* (PANNIZZI et al., 2000; DJOUKENG et al., 2005; CALIS et al., 1997; WOLSKA et al, 2010).

O extrato n-butanol de *Alstonia macrophylla* (Apocyanaceae) e o de *Mallotus pelatus* (Euphorbiaceae), ricos em ácido ursólico, mostraram atividade antibacteriana moderada contra *Staphylococcus aureus*. De acordo com Vechia et al. (2009), o ácido oleanólico e o ácido ursólico apresentam atividade antitumoral potencial e os seus esqueletos oleanano e ursano são farmacóforos promissores na busca de potenciais agentes terapêuticos. No entanto, o mecanismo de ação dos terpenos ainda não é conhecido, acreditando-se que um componente lipofílico produza uma desorganização da membrana celular (VECHIA et al., 2009).

No presente trabalho, além dessas ações em microrganismos comuns, foi evidente a inibição de *Staphylococcus epidermidis* e *Malassezia pachydermatis*, dois microrganismos que na Medicina Veterinária estão associados a otites externas de carnívoros domésticos. Esta infecção é de difícil tratamento com os recursos existentes, devido à ocorrência de recidivas e de resistência a múltiplos antimicrobianos.

O Gênero *Malassezia* pertence ao reino *Eunycota*, divisão *Basidiomycota*, classe *Hymenomycetes*, ordem *Tremellales* e família *Filobasidium uniguttulatum*. As leveduras do gênero *Malassezia* ganharam especial atenção, principalmente na medicina humana, devido a formas recidivantes de dermatites seborréicas em indivíduos imunodeprimidos e às septicemias em neonatos prematuros submetidos a alimentação parenteral (MICKELSEN et al., 1988).

Vários estudos têm descrito os microrganismos da microbiota normal no ouvido canino e a associação entre *S. intermedius*, *S. epidermidis* e *M. pachydermatis* tem sido demonstrada nos quadros de otite externa canina (SCOTT et al., 1996; LILENBAUM et al., 2000; NOBRE et al., 2001). A infecção por bactérias e por leveduras é um fator primário da otite, por serem geralmente oportunistas e complicadores das mudanças iniciadas com outros fatores primários (JACOBSON, 2002). A *M. pachydermatis* tem sido frequentemente associada a dermatites em cães, estando sua intensa proliferação associada a processos de desequilíbrio local e sistêmico (GUILLOT e BOND, 1999). Terapia antibacteriana, glicocorticóides, alergias, dermatite seborréica, distúrbios nutricionais ou hormonais e doenças imunossupressoras, podem ser fatores predisponentes à malasseziose (BOND et al., 1996; GUILLOT e BOND, 1999; CRESPO et al., 2002).

Estima-se que em média 30% dos cães são portadores de leveduras lipofílicas no meato acústico externo. A multiplicação intensa desta levedura está sempre associada à modificação do ecossistema cutâneo e à, manifestação patogênica (PLANT et al., 1992; BOND et al., 1997; PRADO et al., 2007). A *M. pachydermatis* pode ser isolada também dos pêlos, cavidade oral, reto, ânus, mucosa vaginal e sacos anais, mas a colonização das mucosas pode ser secundária à proliferação de leveduras da pele (BOND et al., 1996).

A terapêutica atual da otite externa de cães e gatos utiliza antifúngicos tópicos (nistatina, clotrimazol, natamicina e cetoconazol) associados a antiinflamatórios esteróides, antibióticos e, eventualmente, a acaricidas (MACHADO et al., 2003). A eficácia dos antifúngicos tópicos é duvidosa. Quando necessário o tratamento sistêmico utiliza imidazóis (cetoconazol, miconazol e econazol), triazóis (itraconazol)

e hipossulfito de sódio (COUTINHO, 2003; COSTA e GÓRNIK, 2006; NASCENTE et al., 2003). Existem evidências de resistência de *Staphylococcus epidermidis* de conduto auditivo de cães a antibióticos (rifampicina, tetraciclina, gentamicina, ampicilina e penicilina G (LILENBAUM et al., 2000), mas os insucessos terapêuticos estão mais ligados a falhas no controle da *Malassezia* spp., do que propriamente a resistência das leveduras aos antifúngicos (MACHADO et al., 2003). No entanto, os efeitos sistêmicos indicativos de hepatotoxicidade, náuseas, vômitos, diarreia, erupções cutâneas tóxicas ou idiossincrásicas, são comuns (COSTA e GÓRNIK, 2006).

Por tudo isso, a obtenção de extratos padronizados de *A. chica* com atividade inibidora do crescimento da microbiota do ouvido externo de caninos é promissora e auspiciosa. Além disso, os resultados do presente trabalho mostram a possibilidade de serem desenvolvidos fitoterápicos para afecções cutâneas padronizados nas mais variadas formas farmacêuticas: creme cicatrizante, produto otológico, antisséptico para limpeza de feridas contaminadas e shampoos antissépticos. É nesse sentido que estão sendo direcionados os estudos complementares da Tese aqui apresentada.

8. CONCLUSÃO

Os aspectos relatados nos diferentes métodos utilizados para a avaliação antimicrobiana comprovam o potencial terapêutico de frações padronizadas obtidas do pó das folhas de *Arrabidaea chica*. O estudo de substâncias derivadas de plantas, como protótipos, certamente contribui para a obtenção de fitoterápicos efetivos e menos tóxicos.

9. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, J. M. Planta altamente anti-anêmica. Voz da Nazaré, **Belém**, n. 21, p. 7, fev., 1988.
- ALCERITO, T.; BARBO, F.E.; NEGRI, G.; SANTOS, D. Y. A. C.; MEDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; CHÁVEZ, D.; BLATT, C. T. T. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 677-683, 2002.
- ALVES, F. F.*, ALMEIDA, M. B. S. Aplicação da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) no extrato de *Arrabidaea chica* Verlot. XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, O Jovem e a Ciência no Futuro, p.9, 2001.
- ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; JACOMETTI, N. A.; FURTADO, C.; MARTINS, C. H. G. **Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras.** Quim. Nova. V 31, n5, p1224-1229, 2008.
- ANDRADE, J.S.C.S., OLIVEIRA, D.P.C., SANTOS, L.A., COSTA, P.R.C., SILVA, E. A., BORRAS, M.R.L. *Atividade analgésica e antiedematogênica da Arrabidaea chica Verl.* Resumos: XII Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 1997, Caxambu: FESBE, 1997.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. BRASIL. RDC nº 14/2010 de 31/03/2010 – Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Revogada pela RDC 14/2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 13 Julho de 2010. Publicado no D.O.U. em 05/04/2010.
- BALBACH, A. A flora nacional na medicina doméstica. **São Paulo: a edificação do lar - MVP**, 5ª Ed., Vol. II, s.d.

- BANNERMAN, R. H. La medicina tradicional en la moderna atención de la salud. **Foro Mundial de la Salud**, Ginebra, v. 3, n. 1, p. 8-28. 1982.
- BARATA, L.E.S.; SCHIOZER, A.L.; BRAGA, A.M.P.; SCHREIBER, A.Z.; FERNANDES, L.L. Extratos e composições fitoterápicos a base de *Arrabidaea chica* para emprego como antifúngico e antibacteriano. Patent Invention. PI0600943-3. Unicamp. Patent deposit: 23/02/2006, INPI, Brasil.
- BARBOSA, W.L.R.; PINTO, L.NL; QUIGNARD, E.; VIEIRA, M.S.; SILVA JR, J.O.C.; ALBUQUERQUE, S. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 18(4), p. 544-548, 2008.
- BARON, E.J.; FINEGOLD, S.M. **Diagnostic microbiology**. 8 ed. St. Louis: Bailey & Scott's, 1990.
- BECKER, H.; SCHER, J. M.; SPEAKMAN, J. B.; ZAPP, J. Bioactivity guided isolation of antimicrobial compounds from *Lythrum salicaria*. **Fitoterapia**, v. 76, p.580-584, 2005.
- BERGERON, M.G.; OUELLETTE M. Preventing Antibiotic Resistance through Rapid Genotypic Identification of Bacteria and of Their Antibiotic Resistance Genes in the Clinical Microbiology Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 36, n.8, p. 2169–2172, ago.1998.
- BIBERSTEIN, E. L. **Dermatófitos**. In: HIRSH, C.D.; ZEE, Y.C. Microbiologia Veterinária. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2 ed., 2003.
- BOND, R.; FERGUSON, E.A.; CURTIS, C.E; CRAIG, I.M., LOYD, D.H; Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* populations in dogs with pruritic skin disease. **Journal of Small Animal Practice**, v. 37, p. 103-107, 1996.
- BOND, R.; LLOYD, D.H. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrhoeic Basset Hounds. **Veterinary Dermatology**, v. 8, p. 101-106, 1997.

- BORRÁS, M.R.L. Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas? **Manaus: Valer /Governo do Estado do Amazonas**. 321p, 2003.
- BUERIS, V.; MOREIRA, C. G.; SANTOS, K. R. N.; TEIXEIRA, L. M.; TRABULSI, L. R. *Staphylococcus epidermidis* e outras espécies de *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Rothia* (Stomatococcus). In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 4. ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2005, p. 183 – 187.
- CALIS, T.; SATANA, M. E.; YURUKER, A.; KELICAN, P.; DEMIRDAMAR, R.; ALAÇAM, R. Triterpene saponins from *Cyclamen mirabile* and their biological activities. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 315-318, 1997.
- CARNEIRO, A. L. B.; TEIXEIRA, M. F. S.; OLIVEIRA, V. M. A.; FERNANDES, O. C. C.; CAUPER, G. S. de B.; POHLIT, A. M. Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke Forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 31-38, 2008.
- CASTILHOS, T. S.; GIORDANI, R. B.; HENRIQUES, A. T.; MENEZES, F. S.; ZUANAZZI, J. Â. S. Avaliação *in vitro* das atividades anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcalóide montanina. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 2, p. 209-214, 2007.
- CHAPMAN, E.; PERKIN, A. G; ROBINSON, R. The colouring matters of carajura. **J. Chem. Soc.**, p. 3015-3040, 1927.
- CHOMA, I. M.; GRZELAK, E. M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, 10, p. 1-8, 2011.
- CHU, V.M., BORRAS, M.R.L. Estudo de plantas da amazônia ocidental com atividade cicatrizante. **Manaus**. 107p, 1997.
- CIZMAN, M. The use and resistance to antibiotics in the community. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Birmingham. v. 21, n. 4, p. 297-307, abr. 2003.
- CORRÊA, M.P. *Dicionário de plantas úteis do brasil e das exóticas cultivadas*. **Imprensa Nac. Ministério da Agricultura**. IBDF, Brasília, 6 v. 1984.

COSTA, P.R.C. da et. al. Plantas medicinais nativas e aclimatadas da região amazônica. **Manaus: Imprensa Oficial**, 1990.

COSTA, P.R.C. da, BORRAS, M.R.L., MELO, C.S. de, CYRINO, B.R.B., COSTA, C.M. da, PINTO, A.S. Caracterización Farmacognóstica del Crajiru - *Arrabidaea chica* Verlot. Bignoniaceae. In: X Congreso Italo Latinoamericano de Etnomedicina, 2001, Caracas. Memórias del X Congreso Italo Latinoamericano de Etnomedicina: Sociedad Italo Latinoamericana de Etnomedicina - SILAE. v.10, p. 217-220, 2001.

COSTA, O. E. da; GÓRNIK, S. L. Agentes antifúngicos e antivirais. In: SPINOSA, H. De S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**, 4ª ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006, p. 487-500.

COUTINHO, S.D. Malasseziose: a necessidade de se pesquisar as espécies lipodependentes em Medicina Veterinária. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 1, p. 70-73, 2003.

CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CARBANES, F.J. Occurrence of *Malassezia* spp. In the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. **Medical Mycology**, v. 40, p. 115-121, 2002.

CRONQUIST, A. An Integral System of Classification of Flowering Plants: The Evolution and Classification of Flowering Plants. **New York: Columbia University Press**, 1988.

CUNHA, I.G.B. da, FERREIRA, J.R.D., PIMENTEL, L.F., ARAÚJO, M.L.G. de, FERREIRA, L.C.de L., COSTA, P.R.C.da, ROLAND, I.de A., BORRAS, M.R.L. Effects of *Arrabidaea chica* Verl. (Bignoniaceae) aqueous extract on experimental gastric ulceration. In: XVI Latinamerican Congress of Pharmacology, 2000, Águas de Lindoia, SP. From new molecules to new methods for health and knowledge in the beginning of a new millennium. 2000, p. 217-218.

CUNHA, W. R.; MARTINS, C.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E.; LOPEZ, N. P.; ALBUQUERQUE, S. In vitro trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. **Planta Med.**, v. 69, p. 470-472, 2003.

- DEVIA, B.; LABRES, G.; WOUTERS, J.; DUPONT, L.; ESCRIBANO-BAILON, M. T.; PASCUAL-TEREZA, S.; ANGENOT, L.; TITS, MONIQUE. New 3-deoxyanthocyanidins from leaves of *Arrabidaea chica*. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 114-120, 2002.
- DJOUKENG, J. D.; ABOU-MANSOUR, E.; TABACCHI, R.; TAPONDJOU, A. L.; BOUDA, H.; LONTSI, D. Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *J. Ethnopharmacol.* v. 101, p. 283-286, 2005.
- DOAN, C. H.; DAVIDSON, P. M. Microbiology of potatoes and products: a review. **Journal Food Products**, v. 63, p. 668-83, 2000.
- DOROGI, J. Pathological and clinical aspects of the diseases caused by *Malassezia* species. **Acta. Microbiol. Immunol. Hun.** v. 49, p. 363-369, 2002.
- ELISABETSKY E, SHANLEY P. Ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Pharmacol Ther.** n.64, v.2, p.201-14. 1994.
- ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.
- ENRICONI, A; BORRAS, M.R.L. estudo de plantas da Amazônia Ocidental com aplicação em Dermatologia. **Manaus**. 1996, 72p.
- FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2003. p. 229-245.
- FARNSWORTH, N. R. La medicina moderna y las plantas: un encuentro entre la ciencia y el folklore. **Foro Mundial de la Salud**, Ginebra. V. 6, p. 89-94, 1985.
- FATOPE, M. O.; ADOUM, O. A.; TAKEDA, Y. Oleanene palmitate from *Ximenia americana*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n° 5, p. 391-393, 2000.
- FRANZOLIN, M. R.; CAMPOS, L. C.; TRABULSI, L. R. *Escherichia coli* que causa infecções extra-intestinais. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 4. ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2005, p. 303 – 309.

- FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GRENAND, P., MORETTI, C & JAQUEMIN, H. *Pharmacopées traditionnelles en Guyane; créoles, Palikus, Wayâpi*. Éditions de l'ORSTOM, **Collection Memoires**, n. 108, Paris. 1987.
- GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D.H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. London, v. 54, p. 321–332, ago. 2004.
- GUILLOT, J; BOND, R.: *Malassezia pachydermatis*: a review. **Medical Mycology**, v.37, p. 295-306, 1999.
- HEGNAUER, B. Apud INDEX KEWENSIS. **Supplementum Bignoniaceae**. 1988.
- HIBBET, J.; SMADJA, H. K. Chemical Composition and *in vitro* Antimicrobial Activities. In: JAWETZ, E.; MELNICK, L. J.; ADELBERG, E. A. *Microbiologia Médica*, Ed. Artmed, 7 ed., p. 568, 2007.
- HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infections diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.
- HOSTETTMANN, K; WOLFENDER, J. L.; RODRIGUEZ, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Medica*, v. 63, p. 2-10, 1997.
- ISHIKAWA, N.K. Antimicrobial Cuparene-Type Sesquiterpenes, Enokipodins C e D, from a mycelial culture of *Flamulina velutipes*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 7, p. 932-934, 2001.

- JACOBSON, L.S. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in the dog and cat. **Journal of the South African Veterinary Association**, Pretoria, v.73, n. 4, p. 162-170, 2002.
- KOSINA, P.; GREGOROVA, J.; CRUZ, J.; VACEK, J.; KOLAR, M.; VOGEL, M.; ROOS, W.; NAUMANN, K.; SIMANEK, V.; ULRICHOVA, J. Phytochemical and antimicrobial characterization of *Macleaya cordata* herb. **Fitoterapia**, v. 81, p. 1006-1012, 2010.
- KUJUMGIEV, A.; BANKOVA, V.; IGNATOVA, A.; POPOV, S. Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. **Pharmazie**, v. 48, p. 785–786, 1993.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACARRI, E.M.; MELO, N.K. Tratado de Micologia Médica. 9ª ed., São Paulo, Sarvier Press, 2002.
- LI, D. W.; HYUN, J. H.; JEONG, C. S. KIM, Y. S.; LEE, E. B. Antiinflammatory activity of a-hederin methyl esters from the alkaline hydrolysate of the butanol fraction of *Kalopanax pictus* bark extract. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, p. 429-433, 2003.
- LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.
- LINCOPAN, N.; TRABULSI, L. R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 4. ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2005, p. 359 – 368.
- LILENBAUM, W.; VERAS, M.; BLUM, E.; SOUZA, G. N. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococci* isolated from otitis externa in dogs. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 31, p. 42-45, 2000.
- LOHMANN, L.G. Bignoniaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico, Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB113356>), 2010.
- MACHADO, M. L.S.; APPELT, C. E.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Otites e dermatites por *Malassezia spp.* em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, v. 44, p. 27-34, 2003.

- MAIA, V.C.; BRANDAO, C.I.F.; ANTONY, R.C.; CABRAL, J.A.S.; GADELHA, A.R; BORRAS, M.R.L. Estudo de plantas da Amazônia Ocidental com aplicação em Dermatologia. Resumo Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 46, 1994, **Vitória: SBPC**, 1994.
- MARC, P.; MURIEL, P. F.; PHILIPPE, M. Cosmetic and/or pharmaceutical preparations containing an active quantity of an *Arrabidaea chica* extract. Patent n° WO0152809(A1), Cognis France S.A., 26/07/2001, France.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2ª ed. Fortaleza: Editora da UFC, 1997. 141 p.
- MAZA, L. M. de la; **Atlas de Diagnóstico em Microbiologia** Ed. Artmed, Porto Alegre, 1999
- MEDLEAU, L.; HNILICA, K. A. **Dermatologia de pequenos animais**. São Paulo, Ed. Roca, 2003.
- MELL, C.D. Interesting sources of natural dyestuff Textile colorist. V. 44, p. 321-325. 1922.
- MELLO, B.S.M.; CARVALHO, M.V.; SAMPAIO, A.L.F.; BORRÁS, M.R.; SIANI, A.C.; HENRIQUES, M.G.M.O. Avaliação da atividade antialérgica do Extrato Bruto de *Arrabidaea chica* VERL. (Bignoniaceae). Resumos: XVII Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental – FESBE, 2002.
- MENDES, A.G.R.; SERAFIM, F.G.; SANTOS, S.M.P.B.; CUNHA, I.G.B.; CARDOSO, M.M.C; ESPARA, A.; COSTA, P.R.C.; ROLAND, I.A.; BORRÁS, M.R.L. Avaliação da Atividade Cicatrizante da *Arrabidaea chica* VERL. em Portadores de Queimaduras e Escoriações, atendidos em Centro de Saúde de Manaus-AM. Resumos: XXXIV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Águas de Lindóia-SP, 2002.
- MENDES-GIANNINI, M.J.S.; MELHEM, M.S.C. Infecções fúngicas. In: FERREIRA. A.W.; ÁVILA, S.L.M. Diagnóstico laboratorial. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 216-275, 1996.

- MENGONI, F.; LICHTNER, M.; BATTINELLI, L.; MARZI, M.; MASTOIANNI, C. M.; VULLO, V. In vitro anti-HIV activity of oleanolic acid on infected human mononuclear cells. **Planta Med.**, v. 68, p. 111-114, 2002.
- MICKELSEN, PA; VIANO-PAULSON, M.C.; STEVENS, DA; DIAZ, P. Clinical and microbiological features of infection with *Malassezia pachydermatis* in high-risk infants. **Journal of infectious Diseases**. 6:1163-1168, 1988.
- MITSCHER, L.A.; LEV, L. P.; BATHOLA, M.S.; WU, W. N.; BEAL, J.L. Antimicrobial agents from higher plants. Introduction, rationale and methodology. **Lloydia**, v. 35, p.157-166, 1972.
- MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO, R. *Produtos naturais: estudos químicos e biológicos*. Fortaleza: EdUECE, 2007.
- MULLER, G. H.; KIRK, R.W.; SCOTT, D. W.; **Dermatologia dos Pequenos Animais**. 3ª Ed, São Paulo, Editora Manole, 1985.
- NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; SCHUCH, L. F.; LUCIA-JÚNIOR, T.; FERREIRO, L.; MEIRELES, M. C. A. Evaluation of *Malassezia pachydermatis* antifungal susceptibility using two different methods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n° 4, p. 359-362, 2003.
- NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, P.O.; BARBOSA-JÚNIOR, A.M.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.
- NCCLS. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico: Norma aprovada, v. 23, n. 2, 2003.
- NISHINO, H.; NISHINO, A.; TAKAYASU, J.; HASEGAWA, T.; IWASHIMA, A.; HITAHABAYASHI, K. Inhibition of the tumor-promoting action of 12-O-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate by some oleanane-type triterpenoid compounds. **Cancer Res.**, v. 48, p. 5210-5215, 1988.

- NOBRE, M. de O.; NASCENTE, P. da S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRA, L.; **Drogas Antifúngicas para Pequenos Animais**, Rev. Ciência Rural v. 32 no1, 2002.
- NOBRE, M.O.; CASTRO, A. P.; NASCENTE, P. S.; FERREIRO, L.; MEIRELES, M. C. A. Occurrence of *Malassezia Pachydermatis* and Other Infectious Agents as Cause of External Otitis in Dogs from Rio Grande do Sul State, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 245-249, set. 2001.
- ODDS, F. C. Long-term laboratory preservation of pathogenic yeast in water. **J. Med. Vet. J. Basic Microbiol Mycol**, v. 29, p. 413-15, 1991.
- OLIVEIRA, D. P. C.; MATSURA, M.M.; BORRÁS, M. R. L. Estudo da atividade biológica da *Arrabidaea chica* Verl. Crajiru. **Manaus**: 1995, 45p.
- OLIVEIRA, D.P.C., ANDRADE, J.S.C.S., CHU, V.M., PEREIRA, S.M., MATSURA, M.M., BORRAS, M.R.L. Estudo da Atividade farmacológica da *Arrabidaea chica* Verl. (Bignoniaceae). Resumo: XI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, Resumos, 1996.
- OLIVEIRA, D.P.C.; ANDRADE, J.S.C.S.; CHU, V.M.; MATSURA, M.M.; PEREIRA, S.M.; SILVA, E. A.; BORRÁS, M.R.L. Estudo da Atividade da *Arrabidaea chica* VERL. sobre os Parâmetros Hematológicos em Ratos Wistar. Resumos: XIV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, X FESBE, Caxambu, MG, 1996.
- OLIVEIRA, D. P. C.; LOPEZ-LOZANO, J. L.; BORRÁS, M. R. L.; FERREIRA, L. C. L. Avaliação da atividade anti-inflamatória da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verl. Sobre o Edema Induzido por Venenos de Serpentes Amazônicas. Resumos: Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2006.
- OLIVEIRA, D. P. C.; CHU, V. M.; SILVA, E. S.; BORRÁS, M. R. L. Atividade Cicatrizante da *Arrabidaea chica* VERL., Bignoniaceae. Resumos: Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, XIII FESBE, Caxambu-MG, 1998.
- OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Herbal medicines**. Disponível em: <http://www.who.int>, 2010.

- ORTIZ-ANDRADE, R. R.; GARCIA-JIMENEZ, S.; CASTILLO-ESPANA, P.; RAMIREZ-AVILA, G.; VILALOBOS-MOLINA, T.; ESTRADA-SOTO, S. Alpha-glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: an anti-hyperglycemic agent. **J. Ethnopharmacol.**, v. 109, p. 48-53, 2007.
- PAES, E.R.da C.; ISHIKAWA, D.; SOUZA, C.C.; FERREIRA, L.C.de L.; SANTOS, S. M.P.B.; BORRAS, M.R.L. Formulação de um gel de *Arrabidaea chica* Verl. (Humb. & Bompl.) e sua ação em feridas provocadas na pele de ratos Wistar. *Jornal Brasileiro de Fitomedicina*, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 67-73, 2005.
- PANNIZZI, L.; CATALANO, S.; MIARELLI, C.; CIONI, P. L.; CAMPEOL, E. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Geum rivale*. **Phytother. Res.**, v. 14, p. 561-563, 2000.
- PLANT, J.D.; ROSENKRANTZ, W.S.; GRIFFIN, C.E. Factors associated with and prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 6, p. 879-82, 1992.
- PLANTAMED. Disponível em: <http://www.plantamed.com.br>. Acesso em 13 de Julho de 2010.
- PNUD - PROGRAMA DA ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO. **Tratado de Cooperação Amazônica**. Relatório. Lima, Peru, 1994.
- PRADO, M. R. Isolamento de *Microsporum canis*, *Malassezia spp.* e *Candida tropicalis* em cães: um destaque para teste de sensibilidade de *Malassezia pachydermatis* in vitro. Tese (doutorado em ciências veterinárias) Universidade Estadual do Ceará, 2007.
- PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Malassezia spp.* Em humanos e pequenos animais: uma abordagem teórica. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 207-214, 2007.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Editora Artmed, Porto Alegre, p. 219 -228, 2005.

- RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLER, A. Screening as methods for natural products with antimicrobial activity: review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-149, 1998.
- ROCHA, L. Os segredos das plantas. **Rev. Pharmacia**, São Paulo, n.36, p.53-56, nov. 1994.
- SALEEM, M.; NAZI, M.; SHAIQ-ALI, M.; HUSSAIN, H.; LEE, Y. S.; RIAZ, N.; JABBAR, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Products Reports**, v. 27, p.238-254, 2010.
- SAMPAIO, A. L.F.; CARVALHO, M.V.; ROSAS, E.C.; BORRAS, M.L.; GUIMARÃES, A.C.; SIANI, A. C.; HENRIQUE, M.G.M.O. – Fiocruz. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* Verl. (Bignoniaceae). Resumo: XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, São Paulo, p.43, out. 1998.
- SANT'ANA, P. J. P. A bioprospecção no Brasil - Contribuições para uma gestão ética. **Brasília: Paralelo 15**, 2002.
- SCOGIN, R. Anthocyanins of the Bignoniaceae. **Biochemical Systematics and Ecology** v.8, p.273-276. 1980.
- SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E., **Dermatologia de Pequenos Animais**. Editora Interlivro, 5ª edição, Rio de Janeiro, 1996.
- SHIKANGA, E. A.; COMBRINCK, S.; REGNIER, T. South African *Lippia* herbal infusions: Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. **South African Journal of Botany**, v. 76, p.567-571, 2010.
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Candidíase. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan,. Cap. 25, p. 265-273, 2004.
- SIDRIM, J. J. C.; MEIRELES, T. E. F.; OLIVEIRA, L. M.P.; DIÓGENES, M. J. N. Aspectos clínico-laboratoriais das dermatofitoses. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p.41-49, 2004.

- SILVA, J. C. da; FERNANDES, O. C. C.; MARTINS, M. da S.; RODRIGUES-JUNIOR, A. da C.; TEXEIRA, M. F. S. Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia**, v. 30, p. 48-54, 2010.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2004.
- SMITHSONIAN TROPICAL RESEARCH INSTITUTE. Disponível em: http://biogeodb.stri.si.edu/herbarium/species/15406/?search_key=Arrabidaea+chica. Acesso em 03 de Janeiro de 2011.
- SOARES, A. de O.; MAGALHÃES, I. R. dos S.; ARAUJO, L. M.; COSTA, P. R. C. DA; ROLAND, I. DE A.; BORRÁS, M. R. L. Estudo dos compostos inorgânicos presentes nas folhas de *Arrabidaea chica* Verl. em relação a sua utilização popular como antianêmico. Resumo: XVIII Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FESBE, Resumos, 2003.
- SOUZA, G. C. de; HAAS, A. P. S.; von POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 135-143, 2004.
- SPOONER, F.D.; SYKES, G. Laboratory assessment of antibacterial activity. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W. (EDS.). **Methods in Microbiology**, vol. 7B, Academic Press, London, p. 216–217, 1972.
- SZAKIEL, A.; RUSZKOWSKI, D.; GRUDNIAK, A.; KUREK, A.; WOLSKA, K. I.; DOLIGALSKA, M.; JANISZOWSKA, W. Antibacterial and antiparasitic activity of oleanolic acid and its glycosides isolated from marigold (*Calendula officinalis*). **Planta Med.**, v. 74, p. 1709-1715, 2008.
- TAKEMURA, O. S. Flavonoides em folhas de *Arrabidaea chica* (H & B.) Verlot. Carajuru-Bignoniaceae. 1993. 109p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Curso de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

- TAKEMURA, O. S.; IINUMA, M.; TOSA, H.; MIGUEL, O. G.; MOREIRA, E. A.; NOZAWA, Y. A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. cuprea. **Phytochemistry**, v. 38, p. 1299-1300, 1995.
- TAVARES, W. Problem gram-positive bacteria: resistance in *Staphylococcus*, *Enterococcus*, and *Pneumococcus* to antimicrobial drugs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 281-301, maio/jun. 2000.
- TELLES, M.A.S.; MOSCA, A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59 (1/2), p. 16-19, 2000.
- TERAN, E. Plantas Medicinais da Amazônia: Novas Tendências. **Rev. Racine**, São Paulo, n. 26, p. 26, abr./mai. 1994.
- TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 4. ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2005, p. 175 – 187.
- UDAYAMA, M.; OHKAWA, M.; YOSHIDA, N.; KINJO, J.; NOHARA, T. Structures of three new oleanane glucuronides isolated from *Lathyrus palustris* var. *Pilosus* and hepatoprotective activity. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 46, p. 1412-1415, 1998.
- VALGAS, C. **Avaliação de Métodos de Triagem para Determinação de Atividade Antibacteriana de Produtos Naturais**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.
- VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n° 5, p. 1245-1252, 2009.
- WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of Phenolic Plant Metabolite**. USA: Ed. University of Nebraska at Lincoln, p. 143-167, 1994.
- WECKESSER, S.; ENGEL, K.; SIMON-HAARHAUS, B.; WITTMER, A.; PELZ, K.; SCHEMPP, C.M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine**, v. 14, p. 508-516, 2007.

WILLEMSE, T. **Dermatologia Clínica de Cães e Gatos: Guia para Diagnósticos e Terapia**. São Paulo, Editora Manole 1994.

WILLIAMS, C. A.; GRAYER, R. J. Anthocyanins and other flavonoids. **Natural Product Reports**, v. 21, p. 539-573, 2004.

WOLSKA, K. I.; GRUDNIAK, A. M.; FIECEK, B.; KRACZKIEWICZ-DOWJAT, A.; KUREK, A. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. **Central European Journal of Biology**, v. 5, p. 543-553, 2010.

ZAITS, C.; RUIZ, L.R.B.; SOUZA, V.M. Dermatoses associated with yeasts from *Malassezia* genus. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 2, p. 129-142, mar/abr. 2000.

ZORN, B.; GARCIA-PIÑERES, A J.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; MORA, G.; MERFORT, I. 3-desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 831-835, 2001.

Sites acessados:

ESPOROS E HIFAS DE *Microsporum canis*. Disponível em: http://www.medmicro.wisc.edu/resources/imagelib/mycology/images/microsporum_canis.gif. Acesso em 03 de Janeiro de 2011.

ESPOROS E HIFAS DE *Trichophyton mentagrophytes*. Disponível em: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/imagenes%20de%20galeria/dermatofitos/imagenes/tmentagrophytes4_jpg.jpg. Acesso em 03 de Janeiro de 2011.

ESPOROS DE *Malassezia pachydermatis*. Disponível em: http://timm.main.teikyo.ac.jp/pfdb/image/nishiyama_y_20010917/768x512/019.jpg. Acesso em 03 de Janeiro de 2011.

ANEXOS

Mitsue MM-2 17/12/2010 T=25C Inova300 51838

File: 51838_13C

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: cdcl3

Temp: 25.0 C / 298.1 K

Operator: vnmr1

File: 51838_13C

INOVA-300 "inova300.iq.usp.br"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 1.768 sec

Width 18099.5 Hz

80000 repetitions

OBSERVE C13, 75.4229792 MHz

DECOUPLE H1, 299.9535631 MHz

Power 37 dB

continuously on

WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 2.0 Hz

FT size 65536

Total time 61 hr, 42 min, 38 sec

