



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA
REDE BIONORTE**

**ESTUDO QUÍMICO DAS CASCAS DE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK E O
SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

RENATO ABREU LIMA

**Porto Velho - RO
JUNHO/2016**

RENATO ABREU LIMA

**ESTUDO QUÍMICO DAS CASCAS DE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK E O
SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Rondônia, como requisito final para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. VALDIR ALVES FACUNDO

Porto Velho - RO

JUNHO/2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L732e Lima, Renato Abreu.
Estudo Fitoquímico das Cascas de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek e seu Potencial Sobre Bactérias. Renato Abreu Lima .2016.
188f.: 31 cm.

Orientador: Valdir Alves Facundo
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas

1. Celastraceae. 2. *Maytenus guianensis*. 3. Antimicrobiano. 4. Triterpenos. I. Facundo, Valdir Alves II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

RENATO ABREU LIMA

**ESTUDO QUÍMICO DAS CASCAS DE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK E O
SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Rondônia, como requisito final para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. VALDIR ALVES FACUNDO

Aprovado em: 30/05/2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. Valdir Alves Facundo
Orientador - Presidente da banca

Prof. Dr. Leonardo de Azevedo Calderon
Examinador 2

Prof. Dr. Júlio Sancho Linhares Teixeira Militão
Examinadora 3

Prof. Dr. Andreimar Martins Soares
Examinador 4

Prof. Dra. Fernanda Bay-Hurtado
Examinador 5

**Porto Velho - RO
JUNHO/2016**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família que amo incondicionalmente:

Aos meus pais.

A minha irmã.

A minha sobrinha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser o guia de meus passos e ajudar a tornar real o meu anseio e desejo de ser um bom homem e por me colocar numa família iluminada e abençoada, me dar força sempre quando eu mais preciso e guiar sempre meu caminho para junto dele. Sou grato por tudo que tens transformado em minha vida.

Aos meus pais Raimundo Nonato Lima e Lucicléia Brito Abreu Lima pelo incentivo aos estudos, por apoiarem as minhas escolhas, aos ensinamentos, carinho, amor, otimismo e a vontade de vencer. Enfim, ajudar em tudo que precisei, ouvir as minhas chateações e serem muito pacientes nas horas ausentes.

A minha irmã Emanuela Abreu Lima pela amizade, amor e apoio prestado.

A minha sobrinha Maria Ester que veio a florir nossas vidas, pelas constantes alegrias nos momentos difíceis da minha vida.

Ao meu eterno e fiel amigo Felipe Sant'Anna Cavalcante que me acompanha a seis anos, compartilhando muitas alegrias, risadas e até os obstáculos que a vida nos proporciona. Muito obrigado pelo carinho, amor, ideias, sugestões e pela compreensão da minha ausência em determinados momentos. Obrigado por me ajudar a fazer os testes no Laboratório de Fitoquímica da UNIR, ajudar na busca de artigos científicos, ou seja, em tudo que eu precisei, sempre torcendo por mim todo o tempo, caminhando ao meu lado dando força, estímulo e vontade de vencer. Porque um belo sonho nunca morre!

A Andrina Guimarães Silva Braga, mais que uma amiga, uma irmã que esteve comigo desde o início da graduação, obrigado por tudo, desde as conversas felizes até mesmo as tristes.

As Universidades Federais de Rondônia (UNIR) e a do Amazonas (UFAM) que por serem públicas e gratuitas, permitiu-me realizar esse estudo, hoje expresso neste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Valdir Alves Facundo pela sua competência, dedicação, incentivo e paciência demonstrada durante os momentos difíceis, e principalmente, por aceitar contribuir orientando-me nesse trabalho. É um exemplo para os diversos estudantes que orientou, formando

muitos químicos e biólogos de produtos naturais distribuídos por diversas universidades e institutos federais brasileiros.

Ao professor Dr. Gil Valdo José da Silva do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, pelo auxílio na obtenção dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

Ao professor Dr. Valdemar Lacerda Júnior do Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, pelo auxílio na obtenção dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais (LPQPN) da Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Fernanda, Dionatas, Deyse, Laís Helena, Guilherme, Rodolfo, Rosângela e Priscila pelo companheirismo e pelas conversas que me ajudaram a engradecer como pessoa e pesquisador.

Aos colegas de pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE de muito estudo e dedicação, durante a obtenção dos créditos, mas muito alegres na convivência diária, em especial à minha primeira turma de 2012.

À Isabel, Lúcia, Sílvia e Rosileilia, funcionárias da secretaria da pós-graduação das coordenações Geral e Estadual da BIONORTE, pela paciência de me receber a qualquer hora e de me ajudar com muita boa vontade.

Aos meus professores doutores da pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE: Luciana Gatto, Fábio Barbieri, Wanderley Bastos, Carolina Dória e Andreimar Soares, pela grandiosa contribuição à minha formação acadêmica, são verdadeiros exemplos de pessoa e de pesquisadores.

Ao prof. Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos, meu orientador da graduação e do mestrado, pessoa que tenho um grande reconhecimento e admiração, pois me iniciou na pesquisa científica e despertou em mim a vontade de ser um pesquisador, por meio de suas orientações e conselhos valiosos que sempre terei comigo, muito obrigado.

A prof. Dra. Najla Benevides Matos, que também teve uma importância muito grande nessa minha caminhada, me recebendo de braços abertos em seu Laboratório de Microbiologia do Centro de

Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) em Porto Velho-RO, onde eu considero que tive um amadurecimento e profissionalização científica com sua área de pesquisa. Pessoa que está sempre aberta à realização de novas pesquisas, opiniões e sugestões, e que tem a minha admiração e o meu reconhecimento.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do CEPEM, Diones, Roger, Núcia Cristiane e o Esquerdo que tiveram paciência, companheirismo e me ajudaram muito ao longo da realização dos testes microbiológicos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Termonorte Energia S.A. e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio e auxílio financeiro e material no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, todos aqueles que de forma direta e indireta participaram deste trabalho, meu muito obrigado.

EPÍGRAFE

“O Senhor é meu pastor, nada me faltará” (Salmo 23)

“O Senhor é minha luz e a minha salvação, a quem temerei?” (Salmo 27)

LIMA, Renato Abreu. **Estudo químico das cascas de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek e seu potencial antimicrobiano.** 2016. 188f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2016.

RESUMO

Maytenus guianensis Klotzsch ex Reissek é uma planta da Amazônia Brasileira muito utilizada na medicina popular contra enfermidades como malária, leishmaniose e câncer. Acredita-se que essa ação farmacológica pode estar relacionada à presença de terpenoides presentes no gênero *Maytenus*. Com o aumento dos micro-organismos resistentes às substâncias antimicrobianas já conhecidas, vários extratos de plantas medicinais estão sendo testados com a finalidade de procurar novos compostos com atividade antimicrobiana. Assim, este trabalho visou realizar um estudo fitoquímico e avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos e das substâncias isoladas das cascas de *M. guianensis* sobre bactérias e fungos. As cascas foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke em Manaus-AM, devidamente secas e trituradas, sendo submetidas à extração em aparelho de Soxhlet com diferentes solventes de acordo com o aumento do grau de polaridade. O isolamento e purificação dos constituintes químicos do extrato das cascas foram realizados por meio de cromatografia em coluna utilizando-se como fase fixa sílica gel. As revelações das substâncias cromatografadas de camada delgada se deram por exposição das cromatoplas a luz ultravioleta (250 nm) e por pulverização com revelador universal seguido de aquecimento em estufa a 100°C. A identificação estrutural dos constituintes químicos isolados das cascas de *M. guianensis* foi realizada por meio de métodos espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN-¹H) e Carbono-13 (RMN-¹³C), uni e bidimensional, espectroscopia de massa e espectroscopia na região do infravermelho. Para avaliar o potencial antimicrobiano sobre as bactérias ATCC e patogênicas e fungos, utilizou-se a técnica de difusão em ágar utilizando protocolos específicos para os experimentos. O delineamento foi o inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. A avaliação do teste consistiu em medir o crescimento das colônias das bactérias e fungos, após 24 horas do início do experimento. Os resultados obtidos do estudo fitoquímico até o presente momento permitiram isolar quatro substâncias, sendo dois triterpenos friedelina e friedelanol (triterpeno 29-hidroxifriedelan-3-ona, triterpeno 16β-hidroxifriedelan-3-ona) e triterpenos quinonametídeos (tingenina B e tingenona). Os resultados fitoquímicos deste trabalho em conjunto com os dados descritos na literatura, mostram nitidamente que *M. guianensis* é uma rica fonte de triterpenos das classes dos friedelanos e quinonametídeos, que estes são restritos a família Celastraceae. Além disso, os extratos e as substâncias isoladas das cascas de *M. guianensis* apresentaram efeito inibitório contra pelo menos quatro das cinco bactérias ATCC testadas e fungos, notando-se halos de inibição satisfatórios sendo

inéditos os testes antimicrobianos demonstrando que *M. guianensis* é uma promissora planta para o desenvolvimento de um novo fitoterápico antimicrobiano, e mais estudos devem ser realizados quanto à composição química e entendimento da atividade sobre fatores de virulência das bactérias multirresistentes. Porém, resultados negativos foram encontrados para bactérias patogênicas. Os resultados sinalizam o potencial antimicrobiano dessa planta, podendo esta ser promissora para os estudos de desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-Chave: Celastraceae, *Mayenus guianensis*, Triterpenos Friedelanos e Quinonametídeos, Atividade Antimicrobiana.

LIMA, Renato Abreu. **Chemical study on the bark of *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek and potential antimicrobial**. 2016. 188f. Thesis (Doctoral Degree in Biotechnology) - Federal University of Rondônia, Porto Velho, 2016.

ABSTRACT

Maytenus guianensis Klotzsch ex Reissek is a Brazilian Amazonian plant widely used in folk medicine against diseases such as malaria, leishmaniasis, and cancer. It is believed that this pharmacological action may be related to terpenoids present in species belonging to the *Maytenus* genus. Due to the increase in the number of microorganisms resistant to antimicrobial substances already known, various herbal extracts have been tested in order to find new compounds with recognized antimicrobial activity. Thus, this research aimed to carry out a phytochemical study and evaluate the antimicrobial potential effect of isolated compounds from the bark of *M. guianensis* on bacteria and fungi. The barks were collected in the Adolpho Ducke Forest Reserve, in Manaus, the state capital of Amazonas, Brazil. Subsequently, they were properly dried and ground, and subjected to extraction in Soxhlet apparatus with different solvents according to the degree of polarity. The isolation and purification of the chemical constituents of the extract from the barks were performed through column chromatography, using silica gel as fixed phase. The development of the chromatographed substances in Thin Layer Chromatography was made by exposing the chromatoplates to ultraviolet light (250 nm) and by pulverization using a universal indicator, followed by heating in an oven at 100 °C. The structural identification of the isolated chemical constituents of *M. guianensis* was performed using spectroscopic methods of nuclear magnetic resonance Hydrogen-1 (¹H-NMR) and Carbon-13 (¹³C-NMR), one- and two-dimensional, mass spectroscopy, and spectroscopy in the infrared region. To evaluate the antimicrobial potential effect on ATCC bacteria, pathogenic bacteria, and fungi, it was applied the agar well diffusion technique using specific protocols for the experiments. The design was completely randomized with three replicates per treatment. The test evaluation consisted of measuring the growth of bacteria and fungi colonies, 24 hours after the beginning of the experiment. The results obtained from this phytochemical study, until now, allowed the isolation of four substances: two friedelin and friedelanol triterpenes (triterpene 3-oxo-29-hydroxyfriedelane and triterpene 3-oxo-16β-hydroxyfriedelane) and quinonamethide triterpenes (tingenine B and tingenone). Phytochemicals results of this work in conjunction with the data described in literature clearly show that *M. guianensis* is a rich source of triterpenes classes of friedelanos and quinonamethide, they are restricted to Celastraceae family. In addition, extracts and compounds isolated from the bark of *M. guianensis* presented inhibitory effect against at least four of the five tested bacteria and fungi ATCC, noting satisfactory inhibition halos being novel antimicrobial testing. However, negative results were found

for pathogenic bacteria. Thus, *M. guianensis* plant is a promising for the development of new antimicrobial herbal, and further studies must be made on the chemical composition and understanding of activity on virulence factors of multiresistant bacteria. The results indicate the antimicrobial potential of this plant, which may be promising for drug development studies.

Keywords: Celastraceae, *Mayenus guianensis*, Triterpenes Friedelanos and quinonamethide, antimicrobial activate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas de princípios isolados de plantas	28
Figura 2. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários	30
Figura 3. Distribuição geográfica da família Celastraceae	43
Figura 4. A espécie <i>Maytenus guianensis</i>	48
Figura 5. Cascas coletadas de <i>M. guianensis</i>	122
Figura 6. Obtenção dos extratos das cascas de <i>M. guianensis</i>	122
Figura 7. Cromatografia de coluna do extrato das cascas de <i>M. guianensis</i>	123
Figura 8. Obtenção das amostras da coluna do extrato das cascas de <i>M. guianensis</i>	123
Figura 9. Esquema geral do procedimento experimental com <i>Maytenus guianensis</i>	63
Figura 10. Estruturas dos triterpenos friedelina (1a) e friedelanol (1b).....	66
Figura 11. Estrutura do triterpeno 29-hidroxifriedelan-3-ona.....	67
Figura 12. Estrutura do triterpeno 16 β -hidroxifriedelan-3-ona	68
Figura 13. Estruturas dos triterpenos quinonametídeos, tingenina B (4a) e tingenona (4b)....	69
Figura 14. Inibição de crescimento de <i>S. aureus</i> e MRSA frente aos extratos testados.....	124
Figura 15. Inibição sobre os micro-organismos frente às substâncias testadas	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies do gênero <i>Maytenus</i> ocorrentes no Brasil	46
Tabela 2. Composição fitoquímica dos extratos vegetais das cascas de <i>M. guianensis</i>	65
Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>M. guianensis</i> sobre <i>S. aureus</i>	71
Tabela 4. Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>M. guianensis</i> sobre MRSA.....	72
Tabela 5. Atividade antimicrobiana das substâncias de <i>M. guianensis</i> sobre <i>S. aureus</i>	73
Tabela 6. Atividade antimicrobiana das substâncias de <i>M. guianensis</i> sobre MRSA	74
Tabela 7. Atividade antimicrobiana das substâncias de <i>M. guianensis</i> sobre <i>P. aeruginosa</i> ..	74
Tabela 8. Atividade antimicrobiana das substâncias de <i>M. guianensis</i> sobre <i>K. pneumoniae</i>	75
Tabela 9. Média do crescimento do fungo <i>C. albicans</i>	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC - *American and Type Culture Collection*
CCD - Cromatografia de Camada Delgada
CEPEM - Centro de Pesquisa em Medicina Tropical
CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*
DAEC - *Escherichia coli* difusamente aderente
DMSO - Dimetilsulfóxido
EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa
EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora
EM - Espectrometria de Massa
EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica
ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênicas
GEA - Gastroenterite aguda
INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IV - Espectroscopia na Região do Infravermelho
LB - Luria-Bertani
LPQPN - Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais
LTA - Ácido lipopoliteicoico
MGCE - Extrato das cascas de *M. guainensis*
MGFEH - Eluato hexânico de *M. guainensis*
MGFEC - Eluato clorofórmio de *M. guainensis*
MGFEAC - Eluato acetônico de *M. guainensis*
MGFEAC-1a - friedelina
MGFEAC-1b - friedelanol
MGFEAC-2 - triterpeno 29-hidroxifriedelan-3-ona
MGFEAC-3 - triterpeno 16-hidroxifriedelan-3-ona
MGFEAC-4a - tingenina B
MGFEAC-4b - tingenona
MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
OMS - Organização Mundial da Saúde
POP - Protocolo Operacional Padrão
RMN-¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1

RMN-¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

UNIR - Universidade Federal de Rondônia

UFC - Unidade Formadora de Colônia

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 PLANTAS MEDICINAIS	26
2.2 PRODUTOS NATURAIS	27
2.3 METABÓLITOS	28
2.4 PLANTAS NA PESQUISA CONTRA BACTÉRIAS E FUNGOS	31
2.4.1 BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS	34
2.4.1.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	35
2.4.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	36
2.4.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina (MRSA)	36
2.4.2 BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS	37
2.4.2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	38
2.4.2.2 <i>Escherichia coli</i>	38
2.4.2.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	39
2.4.2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
2.4.2.5 <i>Salmonella arizonae</i>	40
2.4.2.6 <i>Shigella dysenteriae</i>	41
2.4.2.7 <i>Candida albicans</i>	42
2.5 FAMÍLIA CELASTRACEAE	42
2.6 GÊNERO <i>Maytenus</i> JUSS	45
2.7 ESPÉCIE <i>Maytenus guianensis</i> KLOTZSCH ex REISSEK	47
3. OBJETIVOS	51
3.1 GERAL	51
3.2 ESPECÍFICOS	51
4. JUSTIFICATIVA	53
5. MATERIAL E MÉTODOS	56
5.1 ESTUDO QUÍMICO	56
5.2 A COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA	56
5.3 ELABORAÇÃO DO EXTRATO DAS CASCAS DE <i>M. guianensis</i>	56
5.3.1 Alcaloides	56
5.3.2 Glicosídeos cardiotônicos	57
5.3.3 Cumarinas	57
5.3.4 Flavonoides	57

5.3.5 Taninos.....	58
5.3.6 Saponinas	58
5.3.7 Triterpenos	58
5.4 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS CASCAS DE <i>M. guianensis</i>	58
5.4.1 Cromatografia de coluna.....	58
5.5 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DAS CASCAS DE <i>M. guianensis</i>	59
5.6 ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA	60
5.7 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA ANTIBIOGRAMA COM PRODUTOS NATURAIS (POP).....	60
5.7.1 Conceito da técnica	60
5.7.2 Preparação dos reagentes e insumos	61
5.7.3 Preparação do inóculo	61
5.7.4 Plaqueamento do inóculo.....	61
5.7.5 Aplicação dos produtos naturais	61
5.7.6 Leitura dos halos de inibição.....	62
5.7.7 Interpretação dos resultados.....	62
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
6.1 ESTUDO QUÍMICO	65
6.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS DE <i>M. guianensis</i> SOBRE BACTÉRIAS ATCC.....	71
6.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>M. guianensis</i> SOBRE BACTÉRIAS ATCC.....	73
6.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>M. guianensis</i> SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS.....	77
6.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DE <i>M. guianensis</i> SOBRE <i>C. albicans</i>	78
7. CONCLUSÕES	81
8. REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICES.....	109
ANEXOS.....	126

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek, família Celastraceae, constitui parte de um projeto aprovado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio do processo 405277/2013-0 que vem sendo desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais (LPQPN) da Universidade Federal de Rondônia (UNIR) com o objetivo de estudar fitoquimicamente plantas utilizadas na medicina popular.

A biodiversidade brasileira é reconhecida como uma das mais expressivas da biosfera terrestre e tem um papel muito importante no bem-estar e na saúde do homem, ao prover produtos básicos e serviços ecossistêmicos. Com mais de 55 mil espécies vegetais descritas, o que corresponde a 22 % do total mundial, esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado. Aproximadamente 48 % dos medicamentos empregados na terapêutica advêm direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais (ALHO, 2012).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Plantas Mediciniais (IBPM), o mercado de medicamentos fitoterápicos movimenta até 500 milhões de dólares por ano no Brasil e estima-se que no mundo, seria gasto cerca de US\$ 27 bilhões (em torno de 7 % do mercado mundial de medicamentos) com plantas medicinais. O mercado farmacêutico tradicional cresce, mundialmente, de 3 a 4 % ao ano, enquanto o de fitoterápicos sobe de 6 a 7 % (BOTSARIS, 2010).

A utilização de plantas pelo homem objetivando a promoção e manutenção de sua saúde é comprovada historicamente por registros de longa data, como por exemplo, os egípcios, assírios, mesopotâmicos, indianos e chineses. As plantas serviam para afecções variadas, desde febres, distúrbios psicológicos e gastrointestinais, a infecções bacterianas, acne, gota, e até epilepsia, pelo emprego de formulações simples, como cataplasmas, chás, decoctos, pós, defumadouros, tinturas e outras formulações herbais (BALUNAS; KINGHOM, 2005; HALBERSTEIN, 2005).

Com isso, a Fitoterapia é paradoxalmente uma prática moderna. Moderna porque atualmente tem recebido respaldo da comunidade científica, cujos trabalhos de pesquisa têm confirmado os efeitos benéficos dessa forma de tratamento. Uma das causas do crescimento do uso de fitoterápicos, portanto, é justamente a competência científica em estudar, testar e recomendar o uso de determinadas plantas para fins específicos (SILVA, 2005).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos, etc., têm sido objeto de estudos, nos quais já foram comprovadas suas ações farmacológicas por meio de testes pré-clínicos e clínicos. No entanto, poucos desses produtos foram estudados de acordo com protocolos científicos modernos (LAPA et al., 2003).

Produtos de origem botânica são fontes de recursos para a produção de inseticidas, bactericidas e fungicidas, pois possuem substâncias, com diferentes estruturas químicas, desempenhando assim, um papel importante na interação da planta com o meio ambiente (CASTRO; SENA; KLUGE, 2005). Na indústria, os produtos do metabolismo secundário de plantas são fontes de aditivos alimentares, medicamentos, corantes e fungicidas. Atualmente, a bioprospecção por moléculas que apresentem atividade biológica e possam ser utilizadas como fontes de novas drogas têm crescido significativamente (PALMA; PALMA, 2012).

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos. Chama a atenção dos pesquisadores da área de produtos naturais a grande diversidade de estruturas e de propriedades físico-químicas e biológicas dos produtos naturais (GUERRA; NODARI, 2004).

A presença de importantes metabólitos secundários e a identificação de compostos biologicamente ativos (CALIXTO, 2005), faz com que a utilização de plantas medicinais muitas vezes se torne eficiente para o desenvolvimento de novos medicamentos com altas propriedades terapêuticas a fim de curar doenças causadas por diversos micro-organismos.

A família Celastraceae que é composta por 98 gêneros e aproximadamente 1.264 espécies (OLIVEIRA et al., 2006; FONSECA et al., 2007; LORENZI; MATOS, 2008; OLIVEIRA et al., 2012), que são distribuídos em diversas partes do mundo, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais, incluindo o norte da África, América do Sul e Ásia (SPIVEY; WESTON; WOODHEAD, 2002; DUARTE et al., 2010; HURTADO, 2013; MOHAMED; PERWEZ, 2014).

Há vários estudos que demonstram que os princípios ativos da família Celastraceae apresentam interesse biológico e que estes estão associados a flavonoides, sesquiterpenos, alcaloides e triterpenos pentacíclicos (GONÇALVES; ALVES-FILHO; MENEZES, 2005; MICHELIN et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006).

As atividades farmacológicas são popularmente atribuídas à espécie do gênero *Maytenus*, tais como: antirreumática, antibacteriana, antitumoral, antiulcerogênica, anti-inflamatória e imunossupressora (NOZAKI et al., 1986).

Entre as atividades biológicas atribuídas a *Maytenus*, o maior gênero da família Celastraceae, está a atividade antinociceptiva (JORGE et al., 2004), antioxidante (MAGALHÃES et al., 2011), antiplasmodial (HURTADO, 2013), citotóxica e mutagênica (MENEGUETTI et al., 2014), antiparasitária (MENEGUETTI, 2015), antifúngica (LIMA et al., 2016a) e antibactericida (LIMA et al., 2016b).

Nos últimos anos, muitos antibacterianos e antifúngicos têm apresentado pouca eficácia no que diz respeito ao combate às doenças infecciosas, isso ocorre principalmente devido a alta incidência de

infecções causadas por micro-organismos multirresistentes. Partindo desse ponto, os profissionais da saúde enfrentam constantemente um desafio para combater tais infecções (SANTOS et al., 2011).

As bactérias demonstram grande facilidade de resistência à ação dos agentes antibacterianos, ou seja, possuem ou desenvolvem resistência aos mesmos, como por exemplo, cloranfenicol. Entretanto, desde a descoberta dos primeiros antimicrobianos, vêm sendo estudados inúmeros e novos agentes que tenham a capacidade de inibir o crescimento ou mesmo de matar estes micro-organismos (HURTADO, 2013).

Enquanto que nos fungos, especificamente para *Candida albicans*, as medidas de controle incluem o tratamento com derivados azólicos (fluconazol, miconazol e itraconazol) e os poliênicos (anfotericina B e nistatina), atuando de forma tópica ou sistêmica (KURIYAMA et al., 2005), onde a maioria tem motivado estudos clínicos sobre a susceptibilidade *in vitro* de fungos, a novos produtos devido ao aparecimento de espécies resistentes (ALMEIDA et al., 2012).

Por conseguinte, a ocorrência de fatores indesejáveis, tais como o surgimento de resistência de algumas cepas aos antimicrobianos convencionais, o estudo de plantas com propriedades terapêuticas, abrangendo aquelas com atividade antimicrobiana tem crescido bastante, não apenas por constituir-se em recurso terapêutico alternativo, mas ainda permitindo isolar substâncias que podem ter eficácia significativa (ALVES et al., 2006).

A aquisição de resistência aos antimicrobianos trata-se de um fenômeno genético, relacionado com alteração de genes contidos nos micro-organismos, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem à ação das drogas, estes mecanismos de ação podem ser: interferência na síntese da parede celular; inibição da síntese de proteína; interferência na síntese de ácido nucleico; diminuição da permeabilidade ao agente antimicrobiano e destruição da estrutura da membrana celular (TENOVER, 2006).

As substâncias antimicrobianas ou antibióticas representam talvez o maior avanço da farmacoterapia nas últimas cinco décadas ou mais, com progresso sem limites dentro da terapêutica medicamentosa (SIMÕES et al., 2007).

Os antimicrobianos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que, em pequenas concentrações, devem possuir atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas, prevenir o desenvolvimento de micro-organismos resistentes, ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro, estabilidade química, entre outras. A atividade antimicrobiana é um item relevante na caracterização de extratos vegetais, dada à importância e o número bastante grande de doenças infecciosas que acometem o homem (LIMA, 2010; SILVA et al., 2014a).

Algumas plantas apresentam substâncias em sua composição com potencial bactericida e fungicida e, tais plantas devem ser estudadas para serem utilizadas diretamente em ensaios biológicos,

bem como servir de matéria-prima para síntese de novas formulações medicamentosas (CELOTO et al., 2008).

Portanto, ações e medidas devem ser tomadas para reduzir o uso indiscriminado de antibióticos. Considerando-se a diversidade de substâncias que existem nas plantas medicinais e a possibilidade de se encontrarem novas substâncias em paralelo com as resistências antibacterianas e antifúngicas, este trabalho teve como objetivo realizar um estudo fitoquímico e avaliar o potencial dos extratos e substâncias isoladas das cascas de *M. guianensis* sobre as bactérias ATCC *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (ATCC 25923), e bactérias patogênicas *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606/143), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083), *Escherichia coli* enterotoxigênica típica (E 234869), *Escherichia coli* enteroagregativa (ATCC 042) *Salmonella arizonae* (UFAM), *Shigella dysenteriae* (ATCC 13313) e o fungo *C. albicans* (ATCC 10231).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas representaram, durante muitos séculos, a única opção terapêutica para o homem. Há registros de sua utilização em manuscritos sumérios de 5.000 anos a.C. (RASKIN; RIPOLL, 2004). No início do século XIX, com o aprimoramento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. A partir da década de 1990, com o grande avanço da síntese orgânica e novos processos biológicos, 25 % dos fármacos prescritos nos países industrializados foram originários de 120 compostos de plantas (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

Os produtos naturais possuem grande diversidade estrutural de compostos, desta forma, constituem uma importante fonte para descoberta e desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (SAKLANI; KUTTY, 2008). Para isso, a abordagem fitoquímica tem contribuído de forma fundamental, por meio do isolamento e da identificação estrutural de compostos farmacologicamente ativos, facilitados pelo contínuo aperfeiçoamento de métodos cromatográficos e espectroscópicos (PHILLIPSON, 2007).

Assim, as modernas técnicas de triagem, separação e elucidação estrutural têm renovado o interesse das indústrias farmacêuticas por produtos naturais. Entretanto, apesar desse crescente interesse, poucas plantas foram estudadas (SAKLANI; KUTTY, 2008).

O Brasil apresenta potencial para pesquisa de novos fármacos de origem natural, uma vez que possui grande biodiversidade vegetal, contando com 56 mil espécies descritas (MELO; AMORIM; ALBUQUERQUE, 2009). Diniz et al. (2013) afirmam que nos últimos anos tem surgido uma grande preocupação em se conhecer a composição das ervas medicinais da região amazônica, visto que muitas delas são indicadas para as mais diversas enfermidades que acometem o homem.

A Etnobotânica e a Etnofarmacologia são campos interdisciplinares de investigação que foram baseados no conhecimento empírico das civilizações sobre substâncias utilizadas como medicamentos (SIMÕES et al., 2007). Nos últimos anos, muitos estudos têm investigado o verdadeiro potencial dessas plantas com base no seu uso popular e medicinal. Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), divulgou uma listagem oficial de 66 plantas medicinais e suas propriedades curativas. Este fato é motivado pelo interesse em medicamentos à base de produtos naturais, preocupação com os possíveis efeitos colaterais e ainda o valor econômico agregado (BRASIL, 2013).

Contudo, a ANVISA está se mantendo alerta quanto à comercialização indevida de plantas medicinais e seus produtos, por isso torna-se necessário que haja um maior subsídio técnico, científico e cultural para o controle de qualidade da matéria-prima e seus derivados, mantendo a integridade

química das espécies de forma a permitir a autenticação das suas propriedades (YUNES; CECHINEL-FILHO, 2011).

2.2 PRODUTOS NATURAIS

Estima-se que a porcentagem da população que utiliza tratamentos não convencionais, inclusive com plantas medicinais, é de 10 % na Dinamarca, 33 % na Finlândia, 49 % na Austrália, 48 % nos Estados Unidos e 63 % no Brasil. Na América Latina, estes valores tendem a ser maiores, uma vez que nas regiões tropicais, existem diversas espécies de plantas medicinais de uso local, com possibilidade de geração de uma relação custo-benefício bem menor para a população, promovendo saúde a partir de plantas produzidas localmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; VEIGA-JÚNIOR, 2008).

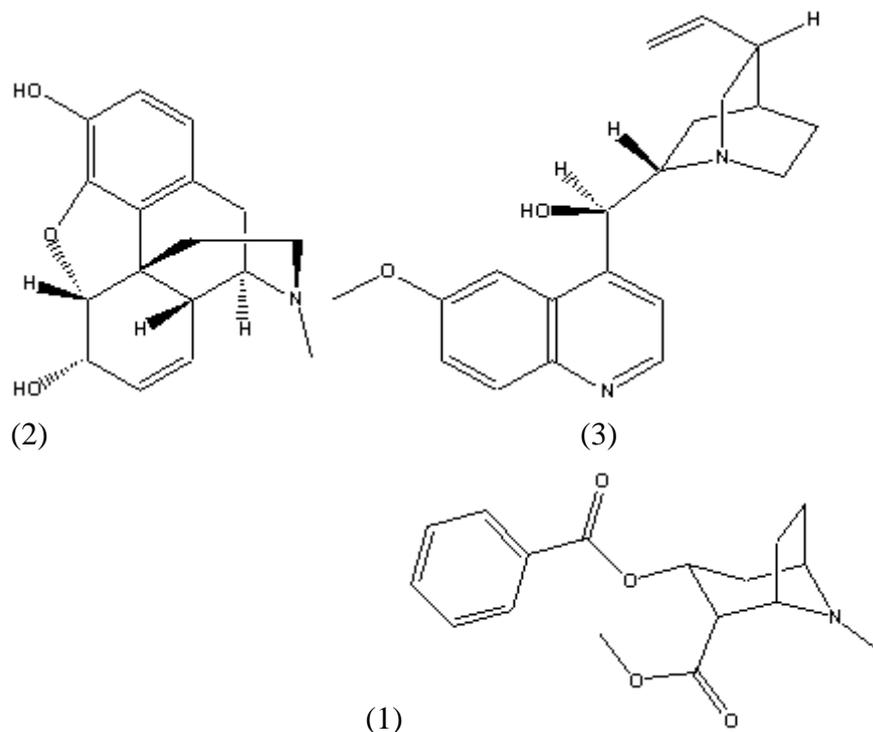
A crise da biodiversidade transformou-se em tema de discussão global, com dados cada vez mais alarmantes (HOEFFEL et al., 2011). Um estudo realizado pela International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN, 2010) sobre espécies vegetais medicinais ameaçadas demonstra que cerca de 380 mil espécies mundiais se enquadram em alguma categoria de ameaça, sendo que uma em cada cinco corre risco de extinção, tornando-as tão ameaçadas quanto os mamíferos. O estudo avaliou uma ampla amostra de espécies coletivamente representativas de todas as plantas do mundo, projetando um retrato global do risco de extinção, revelando as ameaças mais urgentes e as regiões mais afetadas.

Desta forma, alguns potentes fármacos ainda não estão totalmente descobertos, podendo citar alguns exemplos: *Papaver somniferum* L., conhecida popularmente como papoula, planta usada para a extração do ópio, cujo componente majoritário é a morfina, isolada em 1803 por Setuner, cujo princípio ativo é empregado para combater a dor. Posteriormente, em 1932, Robiquet isolou desta mesma planta a codeína, e a papaverina foi isolada em 1948 por Merck. Outros exemplos marcantes são o da *Digitalis purpurea* L. e *D. lanata* Ehr., plantas que foram a origem da descoberta de medicamentos para doenças relacionadas ao coração. Delas extraem-se glicosídeos cardiotônicos, sendo os mais utilizados a digitoxina e a digoxina (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003; CARVALHO, 2004).

O primeiro isolamento de um princípio ativo ocorreu na França em 1804, por Armand Séquin. Alguns princípios ativos isolados de plantas (Figura 1), como morfina, quinina e cocaína, continuam sendo empregados no tratamento de doenças.

Figura 1 - Estruturas químicas de princípios isolados de plantas





Fonte: Montanari; Bolzani (2001)

Nota: Os alcaloides morfina (1), quinina (2) e cocaína (3) sendo visualizados conforme estrutura química

Cabe ressaltar ainda, que devido ao impacto da urbanização e industrialização, os recursos naturais e os conhecimentos da medicina popular estão rapidamente desaparecendo. A maioria das sociedades tradicionais do mundo já não são mais cercadas pelo habitat natural que antigamente servia como base da medicina tradicional e áreas de conhecimento popular que se acumularam e foram se aperfeiçoando por milhares de anos (CALDERON; SILVA; STÁBELI, 2010).

2.3 METABÓLITOS

Dá-se o nome de metabolismo ao conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula. A presença de enzimas específicas garante uma certa direção a essas reações, estabelecendo o que se denomina rotas metabólicas. Os compostos químicos formados, degradados (ou simplesmente transformados) são chamados de metabólitos e as reações enzimáticas envolvidas, são designadas como anabólicas, catabólicas ou de biotransformação (SANTOS, 2007).

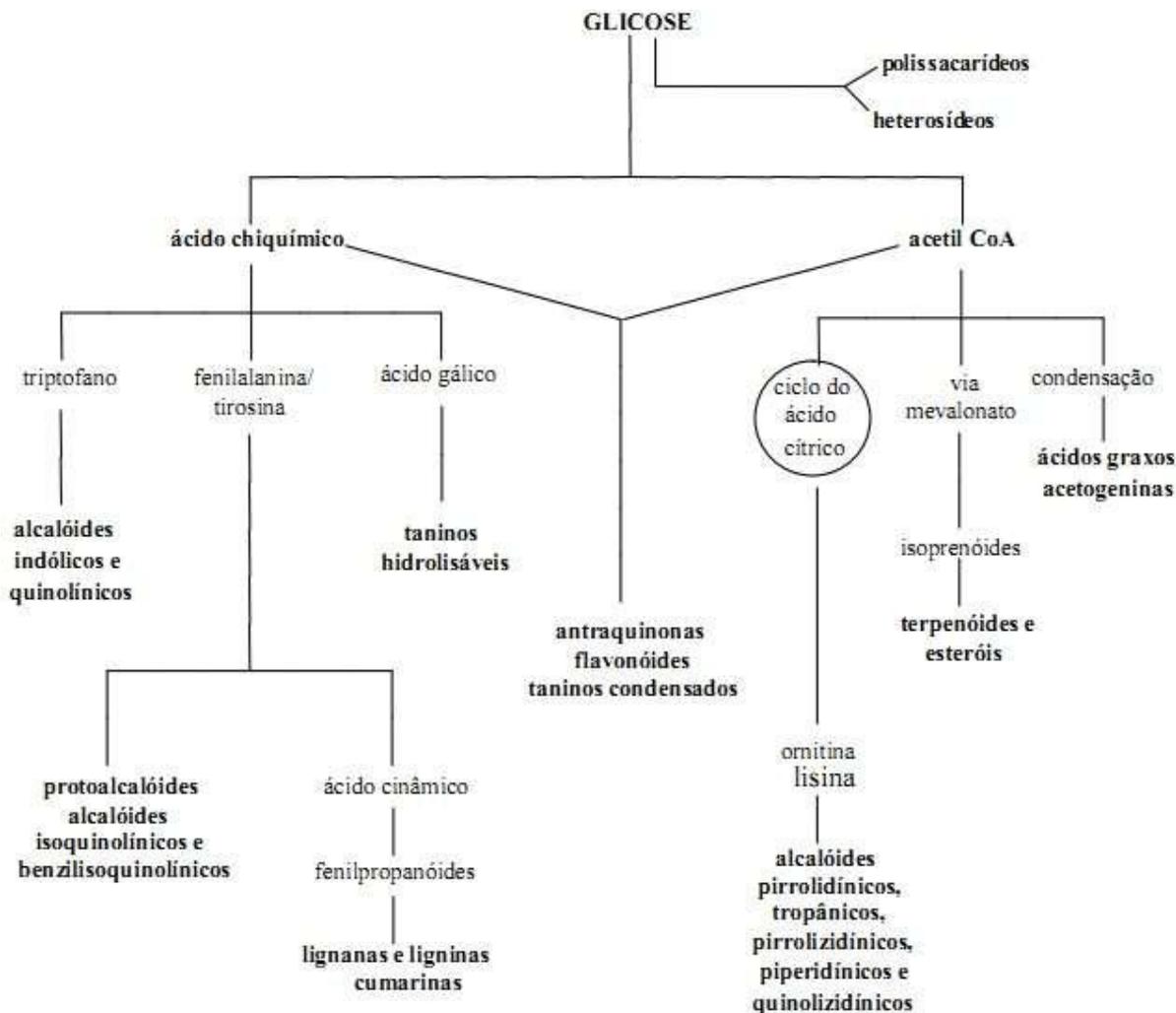
O metabolismo primário compreende o conjunto de processos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Essas reações possuem certa direção devido à presença de enzimas específicas, estabelecendo, assim, as rotas metabólicas, visando o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula. Além do metabolismo primário, responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais, as plantas também apresentam o chamado metabolismo secundário (CHAMPEET; HARVEY; FERRIER, 2008).

Os metabólitos secundários têm muitas funções comuns para as plantas, sendo algumas hormonais, de crescimento, assim como as auxinas, citocininas, ácidos abscísicos e giberelinas. Além disso, possuem ação protetora em relação a estresses de abióticos, como os associados com as mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição a ultravioleta e deficiências de nutrientes minerais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

As plantas são ricas em substâncias que, aparentemente, não estão diretamente relacionadas com os processos metabólitos normais da fotossíntese, respiração e crescimento. A maior parte das espécies de plantas superiores é capaz de biossintetizar e acumular substâncias com alguma atividade biológica em quantidades suficientes para serem extraídas de forma econômica. Tais compostos são chamados metabólitos secundários, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo, garantem vantagens para sua sobrevivência e perpetuação da espécie no planeta (SIMÕES et al., 2007).

Os três maiores grupos de metabólitos secundários são: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Os terpenos são sintetizados a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e também de aminoácidos alifáticos (Figura 2) (BUSTILLO-PARDEY, 2005; SIMÕES et al., 2007).

Figura 2 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários



Fonte: Simões et al. (1999) apud Soares (2013)

Nota: Diferentes metabólitos secundários encontrados em vegetais

Esses compostos podem ser utilizados diretamente ou transformados, sendo utilizados na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e agroquímica. As funções que essas substâncias desempenham no organismo não são todas conhecidas, embora os avanços científicos na área tenham esclarecido muitas funções desses compostos (CASTRO et al., 2004).

Os metabólitos secundários produzidos por plantas tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica sintética moderna. Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas, com base científica. Isso resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas, então conhecidas como medicinais. Desses estudos foram obtidas algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, e que hoje ainda são muito empregados no tratamento de doenças relacionadas ao processo de inflamação, cicatrização e degenerativas (SIMÕES et al., 2007).

Devido a sua frequente presença nos vegetais, facilidade de acesso e variedade de composição química, óleos essenciais e extratos vegetais constituem objeto de extensivo estudo visando à

identificação de atividades biológicas, cujos resultados apontam para potencial terapêutico. Dentre as principais atividades farmacológicas atribuídas, destacam-se: antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, anticolinesterase, anti-helmíntica, antiparasitária, analgésica, sedativa e antitumoral (HENRIQUES; PIRES; APEL, 2009).

A produção destes componentes pode ter várias funções, dentre estas, proteger a planta da herbivoria, do ataque de patógenos, bem como beneficiá-la na competição com outros vegetais. Além disso, favorecem a atração de polinizadores, de dispersores de sementes, bem como de micro-organismos simbiotes. Acrescidos a estes fatores bióticos, a produção de metabólitos secundários também protege o vegetal de influências externas, como temperatura, umidade, exposição à luz ultravioleta (UV) e deficiência de nutrientes minerais (PERES, 2004).

A síntese de metabólitos secundários pode ser afetada por condições ambientais, por representarem uma interface química entre as plantas e o meio ambiente circundante. Os vegetais respondem a estímulos ambientais bastante variáveis, de natureza física, química ou biológica, fatores tais como fertilidade e tipo do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura e poluição atmosférica, dentre outros, podem influenciar e alterar a composição química dos vegetais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

2.4 PLANTAS NA PESQUISA CONTRA BACTÉRIAS E FUNGOS

Desde a descoberta e subsequente uso clínico dos antibióticos, tem-se observado uma resistência a esses agentes, com um comensurável impacto negativo sobre o tratamento das doenças infecciosas. A resistência bacteriana a antibióticos é caracterizada como o principal problema no tratamento de infecções hospitalares e um problema alarmante com o aumento dos índices de resistência bacteriana na sociedade (WRIGHT, 2005).

Com isso, o uso indiscriminado de antibióticos é o que mais preocupa a comunidade científica e profissional da área de saúde, uma vez que existem patógenos humanos que não são susceptíveis a alguns agentes disponíveis bem como no mecanismo de desenvolvimento de resistência que podem ser aplicados contra alguns antibióticos que futuramente possam ser desenvolvidos.

É relatado que em média dois ou três antibióticos derivados de micro-organismos são lançados no mercado a cada ano e cerca de 25 a 30 % da receita expedida nos Estados Unidos tem origem em plantas superiores, entretanto, poucas são utilizadas como antimicrobianos uma vez que temos fungos e bactérias como fonte de remédios para essa atividade (SILVA, 2005).

As doenças infecciosas representam uma causa importante de morbidade e mortalidade entre os seres humanos, principalmente em crianças e idosos (BUTLER; BUSS, 2006). Além disso, a resistência antibacteriana global está a tornar-se um problema de saúde pública (ALMEIDA, 2013).

Embora muitos dos antibióticos mais antigos permaneçam eficazes, o desenvolvimento de novos medicamentos continua a ser crucial (APPELBAUM; JACOBS, 2005).

A grande maioria dos antibacterianos comercializados tem tido como alvo a parede da célula bacteriana ou biossíntese de macromoléculas. As bactérias, no entanto, desenvolvem mecanismos de defesa, por mutação ou aquisição de novos genes de outras bactérias. Essas defesas têm incluído aquisição de enzimas, alteração da permeabilidade da parede celular, proteínas de efluxo, alteração das moléculas alvo, a fim de protegê-las contra ataques de agentes antibacterianos (ALMEIDA, 2013).

A OMS cita que, para o uso racional de medicamentos é preciso em primeiro lugar, estabelecer a necessidade do uso do medicamento; em seguida, que se receite o medicamento apropriado, a melhor escolha de acordo com as regras de eficácia e segurança comprovadas e aceitáveis. É necessário que o medicamento seja prescrito adequadamente na forma farmacêutica, doses e período de duração do tratamento; que esteja disponível a um preço acessível, e que responda sempre aos critérios de qualidade exigidos; que se dispense em condições adequadas, com a necessária orientação e responsabilidade e, finalmente que se cumpra o regime terapêutico já prescrito de maneira adequada (GOLL; FARIA, 2014).

Diante disso, tem sido observado um crescente interesse da comunidade científica pelas plantas medicinais e pela fitoterapia, por apresentarem potenciais terapêuticos e econômicos, visados especialmente pela indústria farmacêutica, que realiza a prospecção de novos produtos, com menos efeitos indesejáveis do que os fármacos existentes (BRANDÃO et al., 2006; LIMA et al., 2006; MEDEIROS et al., 2007; HENDRY et al., 2009). A seleção de patógenos resistentes aos antimicrobianos é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica, e um sério problema em países desenvolvidos e em desenvolvimento, desafiando a antibioticoterapia humana e animal (DUARTE, 2006).

Muitas indústrias farmacêuticas tenham produzidos novos antibióticos e modificado alguns fármacos já existentes, o consumo excessivo de antibacterianos em alguns países, tem resultado no aumento de resistência bacteriana, causando sério problema de saúde pública (DUARTE, 2006; ALMEIDA, 2013).

Além disso, a aceitação popular da fitoterapia tem reforçado a importância de mais estudos nas áreas de Etnobotânica e Etnofarmacologia, a fim de introduzir no mercado, apenas aqueles produtos comprovadamente eficazes e seguros (OLIVEIRA; ALMEIDA; SILVA-FILHO, 2005; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

Por conseguinte, pesquisas diversas têm sido realizadas com o propósito de descobrir e validar as propriedades antimicrobianas de fitoterápicos que possam torná-los aliados como agente efetivos no combate à resistência bacteriana buscando assim novas técnicas de monitoramento de resistência (SILVA, 2005).

Dados sobre a atividade antibacteriana de extratos vegetais frente a vários micro-organismos permitem evidenciar que as plantas medicinais apresentam potencial para o tratamento terapêutico, apesar de muitos destes extratos não terem sido completamente investigados cientificamente. Existe um grande número de espécies vegetais no mundo que são consideradas medicinais e bastante utilizadas pela população, porém ainda são necessários mais estudos científicos sobre a atividade biológica dessas plantas para sua efetiva utilização (CARVALHO et al., 2014).

Alguns exemplos de patógenos que estão se tornando totalmente resistentes aos antibióticos incluem: *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* resistentes a vancomicina (VRE), *S. aureus* resistentes a metilicina (MRSA) e *Acinetobacter baumannii* e *P. aeruginosa* resistente a carbapenemos (WALSH; AMYES, 2004).

Com uma enorme diversidade de plantas medicinais com poder curativo conforme conhecimento popular, a Amazônia é considerada a maior reserva de plantas medicinais do mundo, e os estudos dessas plantas vêm se intensificando, porém a parcela de espécies que foram cientificamente estudadas ainda é muito pequena (BRASIL, 2013).

Produtos de origem vegetal com atividade antimicrobiana possuem uma destacada importância em pesquisas de bioprospecção, pois os antibióticos convencionais no mercado estão cada vez mais ineficientes devido ao aparecimento de cepas com resistência, o que tem se tornado uma preocupação mundial (ANDRADE, 2009). Em vista disso, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo plantas, tem ganhado importância nas companhias farmacêuticas (DUARTE; DEBUR, 2005).

A maioria dos óleos essenciais e extratos vegetais possuem potencial de atividade antimicrobiana. Essa atividade é atribuída à ação das substâncias presentes em sua composição como os compostos fenólicos, monoterpenos, terpenoides, além de outros metabólitos secundários que atuam de forma direta e indireta da parede celular dos fungos (MAIA; DONATO; FRAGA; 2015).

No Brasil, pesquisas voltadas para a descoberta de protótipos de fármacos e/ou fitoterápicos, além de propiciarem o avanço da pesquisa básica multidisciplinar, podem contribuir também para o desenvolvimento tecnológico nacional, se levarmos em conta que a diversidade de metabólitos produzidos nos biomas brasileiros é ainda muito pouco explorada do ponto de vista farmacológico (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Uma vez que as plantas medicinais produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, é necessário que programas de triagem possam descobrir compostos com potencial para o desenvolvimento de novos antibióticos. Entretanto, as investigações científicas visando determinar o potencial terapêutico das plantas são limitadas, existindo a falta de estudos científicos experimentais que confirmem as possíveis propriedades antibióticas de um grande número dessas

plantas. Espera-se que compostos que atinjam, nas células, alvos diferentes daqueles utilizados pelos antibióticos conhecidos, sejam ativos contra patógenos resistentes (DUARTE, 2006).

A resistência bacteriana e fúngica é um sério problema do ponto de vista clínico e de saúde pública, influenciando drasticamente no período de hospitalização, nos índices de morbidade e mortalidade, repercutindo de maneira significativa nos custos, especialmente considerando o prolongamento da internação, o consumo de antibióticos, os gastos com isolamento e os exames laboratoriais (ANDRADE; LEOPOLDO; HAAS, 2006).

Doenças causadas por fungos passaram a receber maior atenção no século passado, principalmente nas duas décadas finais, avanços nas terapêuticas de doenças de base, maior uso de antibacterianos, aprimoramento de técnicas de transplantes, enfim, com a maior sobrevivência de pacientes de variadas enfermidades (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Houve um aumento na incidência de infecções causadas por fungos e bactérias, assim como a sucessiva resistência destes micro-organismos aos antibióticos e antifúngicos convencionais (AGUIAR et al., 2012; AHMED et al., 2012; SPELLBERG; BARTLETT; GILBERT, 2013). Entretanto, tornou-se necessário pesquisar novas substâncias com novos alvos, a fim de combater esta resistência crescente (BARBOSA et al., 2014).

Desta forma, o desenvolvimento de substâncias que atuem inibindo a resistência microbiana ou o seu crescimento é essencial; os vegetais são uma escolha por possuírem metabólitos com múltiplas propriedades e têm contribuído em resultados significativo e eficiente em tratamentos terapêuticos (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

2.4.1 BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS

Muitos micro-organismos são classificados como Gram-positivos e Gram-negativos. Esta classificação baseia-se na coloração ou não pelo método de Gram, porém seu significado ultrapassa de longe o conceito de uma simples reação de coloração empírica. Os micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos diferem em vários aspectos, e não apenas na estrutura da parede celular o que ajuda a diferenciá-los, e possui implicações na ação dos antibióticos (RANG et al., 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A parede é formada também por cerca de 40 a 45 % de polímeros ácidos (que resultam da elevada polaridade da superfície celular e que apresentam carga negativa) e em cerca de 5 a 10 % de proteínas e polissacarídeos. A camada de polímeros fortemente polares influencia a penetração de moléculas ionizadas e favorece a entrada de compostos com carga positiva, como a estreptomicina, na célula (RANG et al., 2004). As gram-positivas estudadas neste trabalho são apresentadas a seguir:

2.4.1.1 *Enterococcus faecalis*

O gênero *Enterococcus* inclui diversas espécies residentes do trato gastrointestinal, da vagina e da cavidade bucal tendo assim, relações comensais. Por outro lado, algumas espécies, como *E. faecalis* e *E. faecium* podem originar doenças, tais como: infecções urinárias e endocardite. Mais de 90 % das infecções humanas enterocócicas são causadas por *E. faecalis*, sendo as demais por *E. faecium*. Outras doenças relacionadas a espécies desse gênero são raras (KAYAOGLU; ORSTAVIK, 2004; PARADELLA; KOGA-ITO; JORGE, 2007).

E. faecalis apresenta poucas exigências para o seu crescimento, sendo capazes de crescer em temperatura entre 10 a 45 °C, pH 9,6 em 6,5 % de solução salina, e de sobreviver a 60 °C por 30 minutos. São micro-organismos facultativos, catalase-negativos, e a grande parte das espécies desse gênero hidrolisam esculina na presença de bile. Para a identificação de enterococos por procedimentos convencionais, testes de fermentação de carboidratos e utilização de piruvato são determinados em meio de infusão cérebro-coração (BHI), contendo bromocresol violeta e 1 % de carboidratos esterilizados por filtração ou piruvato a 1 %. *E. faecalis* cresce em piruvato a 1 %, não fermentando manitol e sacarose (FIGDOR; DAVIES; SUNDQVIST, 2003).

E. faecalis é resistente a diversos antibióticos, como a tetraciclina, gentamicina, ampicilina, benzilpenicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, rifampicina, estreptomicina e vancomicina (SEDGLEY et al., 2005). Isto pode estar associado quando a parede celular dessa bactéria que é formada pelo ácido lipopoliteicoico (LTA), que auxilia na ligação das bactérias às células eucarióticas, incluindo linfócitos. O LTA estimula reabsorção óssea, além de estimular diversas células polimorfonucleadas a liberarem mediadores inflamatórios, contribuindo para o dano tecidual (LIMA; FAVA; SIQUEIRA, 2001; KAYAOGLU; ORSTAVIK, 2004).

A infecção endodôntica causada por *E. faecalis* costuma tornar-se um problema no tratamento de dentes comprometidos endodonticamente, pois este micro-organismo é de difícil eliminação, sendo considerada a espécie bacteriana mais comumente isolada nos casos de tratamento endodôntico (LIN; MICKEL; CHOGLE, 2003; GOMES et al., 2008). Reconhecendo o papel dessa bactéria no fracasso da terapia do canal radicular, torna-se importante desenvolver estratégias que promovam o controle das infecções causadas por este micro-organismo (FERREIRA, 2010).

2.4.1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria que se apresenta em forma de cocos Gram-positivo, são coagulase positivos, maltose e manitol positivos e formadores de colônias pigmentadas, estando associado também a proteína A ao micro-organismo (BALABAN; RASOOLY, 2000). Presente no ar e no ambiente, o *S. aureus* também faz parte da microbiota da pele e mucosas e dos tratos respiratório e gastrointestinal, sendo encontrado na orofaringe dos seres humanos com prevalência de 35 a 40 % e na boca e saliva de 10 a 35 % (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Apresentam diâmetro compreendido entre 0,5 a 1µm, são micro-organismos imóveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos e catalase-positivos, e crescem em meio contendo 10 % de cloreto de sódio, e em temperatura que varia entre 18 a 40° C (MURRAY et al., 2004).

São bactérias anaeróbicas facultativas, porém crescem melhor aerobicamente. Crescem bem sob condições de alta pressão osmótica e pouca umidade. Esta habilidade também explica como *S. aureus* pode crescer em certos alimentos que apresentam alta pressão osmótica ou em alimentos com pouca umidade que tendem a inibir o crescimento de outros micro-organismos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Os mecanismos de patogenicidade atribuído ao *S. aureus* estão relacionados aos fatores de virulência na forma de toxinas, enzimas e outras proteínas associadas à parede celular, mediadas por genes plasmidiais ou cromossômicos que combinados conduzem à doença (CUNHA; CUNHA, 2007).

2.4.1.3 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA)

A preocupação da comunidade médica e científica acerca da emergência de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos remonta desde o início do uso desses medicamentos, quando foi isolada a primeira cepa produtora de β-lactamase (LOWY, 2003).

Contudo, a população em geral sempre esteve alheia a esses fatores, até porque, após a contaminanação de *S. aureus* resistente à vancomicina, essa preocupação atingiu o cidadão comum. Dentre todas as infecções hospitalares registradas na Inglaterra, mais de um quinto são causadas por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (CEPEDA et al., 2005) e o número de mortes por essas infecções sofreu um aumento de 122 % entre 2001 e 2005.

A identificação de MRSA deve ser rápida para evitar uma disseminação das cepas resistentes pelo hospital. O isolamento de pacientes MRSA positivos é recomendado em diversos países, porém se for realizado após dois dias ou mais da admissão do portador de MRSA pode se tornar ineficiente na contenção da disseminação dessas cepas. Contudo, caso o portador seja isolado em no máximo 24 horas após a admissão, a transmissão de MRSA é consideravelmente reduzida (CUNNINGHAM et al., 2007).

2.4.2 BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

As bactérias gram-negativas possuem paredes celulares que consistem de uma ou poucas camadas de peptidoglicana e uma membrana externa. A peptidoglicana está ligada a lipoproteínas na membrana externa e está no periplasma. As paredes celulares Gram-negativas não contêm ácidos teicoicos. Pela razão destas bactérias possuem uma pequena quantidade de peptidoglicano, tornam-se mais suscetíveis ao rompimento mecânico (NIKAIDO, 2003).

A membrana externa da célula Gram-negativa consiste de lipopolissacarídeos, que atuam como antígenos bacterianos, lipoproteínas e fosfolipídeos, e fornece um mecanismo de defesa a estas bactérias, sendo uma barreira para certos antibióticos, enzimas digestivas, detergentes, entre outros. Entretanto, a membrana externa possui canais proteicos, denominados de porinas, que permitem a passagem de moléculas necessárias para o metabolismo bacteriano, sendo também a passagem para alguns antibióticos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

São todos anaeróbios facultativos, fermentam a glicose e podem gerar energia por redução de nitratos a nitritos, são móveis ou imóveis e não formam esporos. Todos os membros podem crescer rapidamente em condições aeróbias e anaeróbias e possuem exigências nutricionais simples (KONEMAM et al., 2001; MURRAY et al., 2004; STROHL; ROUSE; FISCHER, 2004). As gram-negativas estudadas neste trabalho são apresentadas a seguir:

2.4.2.1 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter é um gênero pertencente à família Moraxellaceae, da ordem Gammaproteobacteria. O gênero *Acinetobacter* spp., compreende aproximadamente 31 espécies diferentes, sendo que 17 delas não foram nomeadas, pois raramente são isoladas em humanos (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). *A. baumannii* é a espécie mais importante clinicamente, fazendo parte do complexo *A. baumannii-calcoaceticus* que compreende outras três diferentes espécies (*A. pittii*, *A. nosocomialis* e *A. calcoaceticus*). A distinção dessas espécies requer métodos avançados de biologia molecular, que não são utilizados de rotina no laboratório clínico (MARTINS; BARTH, 2013).

A. baumannii é responsável por diferentes tipos de infecções, como pneumonias, septicemias, infecções urinárias e meningites, especialmente em pacientes imunodeprimidos, tais como pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), sendo considerado um patógeno oportunista de grande importância e relevante nas infecções nosocomiais (GIAMARELLOU; ANTONIADOU; KANELLAKOPOULOU, 2008; LIMA; OLIVEIRA; PAULA, 2008).

Nos últimos anos, o tratamento das infecções causadas pelo *Acinetobacter* tem se tornado crítico, em função do surgimento de cepas multirresistentes cuja disseminação tem sido associada à contaminação de equipamentos hospitalares e até mesmo por meio do contato das mãos colonizadas da equipe assistencial (GIAMARELLOU; ANTONIADOU; KANELLAKOPOULOU, 2008). Além disso, várias espécies têm sido isoladas do solo, da água, de vegetais, de animais, da pele e do trato gastrointestinal de seres humanos saudáveis (BERNARDS et al., 2004).

2.4.2.2 *Escherichia coli*

Nos primeiros momentos de vida, *E. coli* é uma das bactérias que são adquiridas dos alimentos e começam a habitar o intestino grosso dos seres humanos. Esta bactéria faz parte da flora normal ao longo da vida (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O gênero *Escherichia* pertence à família Enterobacteriaceae. A bactéria *E. coli* é parte da flora normal do cólon em seres humanos e em outros animais, mas pode ser patogênica dentro ou fora do trato gastrointestinal. Esta bactéria possui fímbrias ou pili que frequentemente são importantes para a sua aderência na superfície das mucosas do hospedeiro, e as diferentes cepas podem ser móveis ou imóveis. A maioria das cepas de *E. coli* são capazes de fermentar a lactose, sendo denominadas de lactose positiva. São todas anaeróbicas facultativas, fermentam glicose e podem gerar energia por redução do nitrato a nitrito (STROHL; ROUSE; FISCHER, 2004).

E. coli é um dos micro-organismos comumente envolvidos em septicemia por Gram-negativos e em choque induzido por endotoxinas. As infecções do trato urinário e de feridas, a pneumonia em pacientes imunossuprimidos hospitalizados e as meningites em neonatos são outras formas comuns de infecções causadas por *E. coli* (KONEMAN et al., 2001).

Certas cepas de *E. coli* podem causar enterite ou gastroenterite por seis mecanismos diferentes que causam seis síndromes distintas. As *E. coli* diarreio gênicas podem ser denominadas de ETEC (*E. coli* enterotoxigênicas), EPEC (*E. coli* enteropatogênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), EAEC (*E. coli* enteroagregativa) e DAEC (*E. coli* difusamente aderente) (MURRAY, 2004).

2.4.2.3 *Klebsiella pneumoniae*

Estas bactérias são bacilos grandes e imóveis que apresentam uma cápsula avolumada e são lactose positiva (STROHL; ROUSE; FISCHER, 2004). As espécies de *Klebsiella* estão amplamente distribuídas na natureza e no trato gastrointestinal dos seres humanos e animais (KONEMAN et al., 2001).

A *K. pneumoniae* pode causar uma forma clássica de pneumonia primária, que geralmente ocorre em pacientes em condições debilitantes, como alcoolismo, diabetes melito e doença pulmonar obstrutiva crônica. Este tipo de pneumonia tende a ser destrutiva, com necrose extensa e hemorragia, resultando na produção de escarro, que pode ser espesso, mucoide e de cor vermelha. Em casos graves, podem ser formados abscessos de pulmão, doença cavitária crônica e hemorragia interna (KONEMAN et al., 2001).

A maior incidência de infecções por espécies de *Klebsiella* durante a década passada provavelmente reflete um aumento das infecções nosocomiais em pacientes debilitados ou imunossuprimidos e tendência a uma maior resistência aos antibióticos. As *Klebsielas* têm tendência a

alojar plasmídeos de resistência aos antibióticos e virtualmente todas as cepas isoladas de casos clínicos são resistentes a ampicilina, carbenicilina e ticarcilina (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

2.4.2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Os componentes do gênero *Pseudomonas*, pertencem a um grande grupo de bastonetes Gram-negativos ativamente móveis e aeróbios não-fermentadores. Cerca de 1/3 das amostras isoladas de casos clínicos é pigmentado e produz colônias com uma cor verde ou verde-azulada característica, devido ao pigmento hidrossolúvel piocianina (TODER, 2002).

O patógeno humano *P. aeruginosa*, é amplamente distribuído na natureza. Pode colonizar seres humanos saudáveis sem causar doenças, mas também é um patógeno oportunista significativo que causam infecções hospitalares, como a pneumonia, infecção do trato urinário, infecções de feridas operatórias, infecções em queimaduras graves e em pacientes recebendo quimioterapia para doenças neoplásicas (STROHL; ROUSE; FISCHER, 2004).

P. aeruginosa produz várias substâncias consideradas como responsáveis pelo aumento de colonização e infecção dos tecidos dos hospedeiros. Essas substâncias, juntamente com uma variedade de fatores de virulência, incluindo exotoxina A, leucocidina, viscosidade extracelular, proteases, fosfolipases e várias outras enzimas tornam a *P. aeruginosa* uma das bactérias de maior importância clínica (KONEMAN et al., 2001).

Esta importância clínica está baseada na resistência natural aos diversos antibacterianos de uso habitual. A produção de uma β -lactamase cromossomal, a impermeabilidade da membrana, a capacidade de colonizar superfícies em forma de biofilme, a presença de sistema de efluxo, a aquisição de plasmídeos de resistência, entre outros, fazem com que poucos antibióticos sejam efetivos contra esta espécie. Recentemente, a maior importância tem sido dada ao aparecimento de β -lactamases de amplo espectro de atividade, bem como carbapenemases que degradam o antibiótico imipinem e o meropenem (LINCOPAN; TRABULSI, 2005).

Além disso, *P. aeruginosa* são capazes de sintetizar um grande número de enzimas diferentes e provavelmente contribuem significativamente para a decomposição de substâncias químicas, tais como pesticidas, os quais são adicionados ao solo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

2.4.2.5 *Salmonella arizonae*

Salmonella é o gênero de maior relevância na família *Enterobacteriaceae* e na atualidade este é dividido em duas espécies *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (RODRIGUES; LÁZARO; REIS, 2008).

O gênero *Salmonella* representa um dos mais importantes grupos de bactérias patogênicas que podem estar presentes nos alimentos, principalmente os de origem animal, e um dos principais responsáveis por causar infecções alimentares. Além disso, os surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) constituem um desafio às indústrias alimentícias e aos órgãos de Saúde Coletiva, sendo o hambúrguer, tanto de carne bovina quanto o misto, um dos alimentos mais frequentemente relacionado a estes surtos. As infecções alimentares, relacionadas com este produto, principalmente causadas por *Salmonella* spp., são denominadas salmoneloses (FORTUNA, 2013).

A *Salmonella* é conhecida mundialmente como o agente causador de toxinfecções alimentares em seres humanos (LAN et al., 2009) e estudos recentes revelam que existam aproximadamente 80,3 milhões de casos anuais de doenças de origem alimentar relacionada com esse patógeno em todo o mundo (MAJOWICZ et al., 2010).

Cepas de *Salmonella* spp., que são resistentes aos agentes antimicrobianos constituem um risco para a saúde coletiva, por comprometerem o tratamento eficaz de salmoneloses em seres humanos e em outras espécies de animais. Os indivíduos infectados com cepas resistentes aos antimicrobianos são mais propensos a sofrer de um evento adverso à saúde, como doença prolongada, aumento da gravidade da doença, hospitalização ou morte, do que aqueles infectados com cepas sensíveis (COOK et al., 2009). Deste modo, o aparecimento substancial de multirresistência em cepas de *Salmonella* spp., de origem alimentar implica na necessidade de um uso mais prudente dos antimicrobianos (FORTUNA, 2013).

2.4.2.6 *Shigella dysenteriae*

A bactéria do gênero *Shigella* é um bacilo Gram-negativo da família Enterobacteriaceae de que se identificam quatro espécies e mais de 40 sorotipos. É um dos agentes de gastroenterite aguda (GEA) em todo o mundo, particularmente nos países em vias de desenvolvimento. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), ocorrem anualmente 1,1 milhão de casos, sendo que mais de 99 % dos casos ocorrem em crianças de países em desenvolvimento com idade inferior a cinco anos (KOSEK; YORI; OLORTEGUI, 2010; NUNES et al., 2012).

A shigelose é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um dos principais problemas mundiais de saúde pública. A doença é causada por quatro espécies do gênero *Shigella* e está entre as principais causas de diarreia em crianças, principalmente nos países em desenvolvimento, porém também é responsável por diarreia nos países desenvolvidos. Com relação ao modo de transmissão, o risco de contrair a shigelose está associado à falta de saneamento básico e/ou de higiene pessoal (FULLÁ et al., 2005; PENATTI et al., 2007; BASTOS; LOUREIRO, 2010).

Estima-se que *Shigella* é responsável por aproximadamente 500 mil casos de diarreia, causando aproximadamente 6.231 casos de internações e 70 óbitos nos Estados Unidos, anualmente. O gênero

Shigella ficou em terceiro lugar entre os patógenos de origem alimentar em 2004, segundo a *Foodborne Diseases Active Surveillance Network* (Foodnet) do Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2007).

2.4.2.7 *Candida albicans*

O gênero *Candida* é composto por fungos leveduriformes hialinos, que apresentam duas formas de reprodução: assexuada ou anamorfa e sexuada ou teleomorfa. Taxonomicamente são enquadradas no grupo dos ascomicetos, visto que a reprodução sexuada é caracterizada pela produção de ascos (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Candida albicans causa 50-60 % das todas as candidemias diagnosticadas seguida de *C. parapsilosis* (10-20 %) e *C. tropicalis* (6-7 %). Infecções da corrente sanguínea por *Candida* spp. apresentam mortalidade elevada e são responsáveis pelo aumento dos custos hospitalares (ALFONSO et al., 2010).

A candidíase consiste em uma extensa variedade de síndromes clínicas causadas por um fungo do gênero *Candida*, constituído de aproximadamente 200 espécies diferentes de leveduras, que vivem normalmente nos mais diversos nichos corporais (PEIXOTO et al., 2014).

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância, pela alta frequência com que infectam e colonizam o hospedeiro humano. Espécies de *Candida* são encontradas no tubo gastrointestinal em 80 % da população adulta saudável. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30 % apresentam colonização por *Candida* vaginal, e em hospitais, o gênero *Candida* responde por cerca de 80 % das infecções fúngicas documentadas, representando um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas das infecções causadas por tais agentes (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Esta espécie é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, mas casos de resistência adquirida a antifúngicos azólicos são conhecidos em pacientes expostos prolongadamente a estes medicamentos. Quanto à resistência a anfotericina B, os relatos são mínimos (MAGEE; MAGEE, 2005; TIRASCHI et al., 2007).

Dentre os fármacos mais utilizados para o tratamento da candidose oral, destacam-se os derivados azólicos (fluconazol, miconazol e itraconazol) e os poliênicos (anfotericina B e nistatina), atuando de forma tópica ou sistêmica (KURIYAMA et al., 2005).

2.5 FAMÍLIA CELASTRACEAE

A família Celastraceae distribui-se nas regiões tropical e subtropical, incluindo o norte da África, América do Sul e Ásia, particularmente na China, contendo 98 gêneros e aproximadamente

1.264 espécies (SPIVEY; WESTON; WOODHEAD, 2002; DUARTE et al., 2010). No Brasil, essa família é representada por quatro gêneros: *Austroplenckia* Lund., *Franhoferia* Mart., *Maytenus* Juss. e *Salacia* Mart. (OLIVEIRA et al., 2006) (Figura 3).

Figura 3 - Distribuição geográfica da família Celastraceae



Fonte: Stevens, 2006

Nota: As áreas em escuro mostram a distribuição de espécies da família Celastraceae ao longo do mundo

Geralmente, as espécies dessa família se caracterizam por serem árvores, arbustos e raras vezes trepadeiras; possuem folhas simples, opostas e dentadas; flores não vistosas e pequenas (tetrâmeras ou pentâmeras), verdes claras ou brancas; frutos encapsulados e, sementes com arilo branco ou laranja (NUÑEZ et al., 2005; SOUZA; LORENZI, 2008).

Para Valladão et al. (2009), as espécies da família Celastraceae apresentam folhas simples, alternas ou opostas; coriácea ou membranosa; pecioladas; com lâmina inteira; estipuladas inconspícuas ou sem estípulas, e sem meristema basal persistente. Em geral, os membros deste grupo de plantas apresentam folhas resinosas com epiderme mucilagínosa, lâmina com cavidades secretoras; mesófilos com idioblasto esclerenquimatoso e ductos menores sem floema.

Numerosas espécies da família Celastraceae são conhecidas especialmente na China e América Latina por seu uso como inseticida, bactericida e fungicida na agricultura tradicional e também para o tratamento de doenças como distúrbios estomacais, artrite reumatoide, antiulcerogênica, imunossupressora, ação curativa de feridas na pele, antirreumática e câncer (SPIVEY; WESTON; WOODHEAD, 2002; FONSECA et al., 2007).

Espécies da família Celastraceae, ressaltando o gênero *Maytenus*, tem sido objeto de inúmeras investigações fitoquímicas e muitos metabólitos secundários apresentam atividades biológicas. As

principais classes de metabólitos descritos incluem os triterpenos pentacíclicos friedelânicos e quinonametídeos, sesquiterpenos, secofriedelanos, esteroides, derivados agarofurânicos, glicosídeos, proantocianidinas, flavonoides glicosilados, alcaloides piridínicos sesquiterpênicos e as catequinas (HURTADO, 2013).

Diversas substâncias isoladas de espécies da família Celastraceae apresentam propriedades biológicas interessantes, por exemplo:

- Glicosídeos cardiotônicos: um glicosídeo da aglicona digitoxigenina. O composto elaeodendrosídeo W, isolado dos troncos de *Elaeodendron alluaudianum*, apresenta atividade antiproliferativa contra câncer de ovário humano. Existem aproximadamente, 40 espécies do gênero *Elaeodendron*, sendo encontradas no México, Madagascar, Índia e Austrália (HOU et al., 2009).
- Triterpenos pentacíclicos: são formados por um esqueleto de três átomos de carbono que podem estar dispostos em cinco anéis de seis membros (NUÑEZ et al., 2005). O ácido populnônico, isolado das cascas de *Austroplenckia populnea*, apresenta atividade anti-inflamatória. Essa planta é encontrada no Cerrado brasileiro e muito utilizada na medicina popular para o tratamento de disenterias e inflamações, como o reumatismo (ANDRADE et al., 2007).
- Sesquiterpenos: com esqueleto básico de di-hidro- β -agarofurano. Essa estrutura compreende anéis A e B na forma de uma decalina, possuindo uma ponte tetra-hidrofuranil fundida. Esse isolado das folhas de *Celastrus vulcanicola*, apresenta atividade de inibição fotossintética. Os constituintes isolados desta planta e sua atividade biológica ainda não tinham sido investigados. *C. vulcanicola* é uma trepadeira lenhosa subtropical distribuída na América Central e no Caribe (TORRES-ROMERO et al., 2008).
- Alcaloides sesquiterpênicos piridínicos: com esqueleto básico de sesquiterpeno do tipo di-hidro- β -agarofurano com ácido dicarboxílico piridínico incorporado. A substância opositina A, isolada dos troncos de *Pleurostyliia opposita*, apresenta moderada atividade citotóxica contra células tumorais de colo humano (WHITSON et al., 2006).
- Triterpenos quinonametídeos: são metabólitos secundários restritos a plantas superiores da família Celastraceae (CORSINO et al., 2000). Tingenona é uma substância isolada das raízes de várias espécies da família Celastraceae, por exemplo, *Austroplenckia populnea* (DUARTE et al., 2006) e *Hippocratea excelsa* (MENA-REJÓN et al., 2007). Apresenta numerosas atividades biológicas, tais como: *Trypanossoma cruzi* (DUARTE et al., 2006), *Giardia intestinais* (MENA-REJÓN et al., 2007) e inibição da proteína tubulina que pode ser o modo de ação que justifica a atividade citotóxica e antitumoral (MORITA et al., 2008).

- Flavonoides glicosilados: da classe dos flava-3-ol. O metabólito 3-benzoato(-)-epicatequin-5- β -glicosila, isolado das partes aéreas de *C. orbiculatus*, apresenta moderada atividade antioxidante. Esta planta é utilizada na medicina popular para o tratamento de artrite, infecções bacterianas e como tranquilizantes e é amplamente distribuída na China (GUO et al., 2004).
- Diterpenos: apesar de serem pouco frequentes na família, os de esqueleto isopimarano e abietano têm sido os mais isolados. A substância triptolida, isolada das cascas das raízes de *Tripterygium wilfordii*, apresenta potente atividade contra a larva de *Mythimna separata* (LUO et al., 2004).

2.6 GÊNERO *Maytenus* JUSS.

O gênero *Maytenus* é o maior e mais diversificado da família Celastraceae e está inserido na subfamília Celastroideae, seção Oxphylla, que é restrita a América do Sul (CARVALHO-OKANO; LEITÃO-FILHO, 2004).

Este gênero possui cerca de 200 espécies tropicais; dentre estas, 76 espécies e 14 variedades são encontradas no Brasil, principalmente na Região Sul (NEGRI; POSSAMAI; NAKASHIMA, 2009). Espécies deste gênero são encontradas na Floresta Amazônica, Floresta Atlântica, Cerrado, Caatinga e no campo rupestre. Muitas espécies deste gênero são utilizadas na medicina popular, morfologicamente, esse gênero é formado por árvores, arbustos ou subarbustos. As folhas têm forma variada, que pode ser crenada, serrada ou aculeada nas margens. Possuem flores inconspícuas, esverdeadas e fruto cápsula (CARVALHO-OKANO; LEITÃO-FILHO, 2005).

O gênero *Maytenus* há muito tempo já é utilizado na África do Sul como remédio anti-inflamatório e analgésico por via oral e tópica. Dentre as espécies, a *M. aquifolium*, conhecida popularmente como “espinheira santa”, mostrou atividade anti-inflamatória com o extrato hidroalcolico (KIMURA et al., 2000).

Pesquisas revelam que a casca das árvores de *M. senegalensis* vem sendo usada em regiões africanas, pela medicina popular, para o tratamento de reumatismo, diarreia, dispneia e infecção de olhos (MATU; VAN STADEN, 2003).

Tem havido um aumento significativo no interesse em plantas do gênero *Maytenus*, especialmente no Brasil, que apresenta quase 40 % das espécies conhecidas (CARVALHO-OKANO; LEITÃO-FILHO, 2004), que ocorrem no: Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Roraima), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina), sendo algumas utilizadas na medicina tradicional, para o tratamento de diversas enfermidades conforme pode ser observado na Tabela 1:

Tabela 1 - Algumas espécies do gênero *Maytenus* ocorrentes no Brasil

Espécie	Ação descrita pela medicina tradicional	Referências
<i>Maytenus aquifolia</i> Mart (Espinheira-santa)	Antiúlcera e analgésico	TIBERTI et al., 2007; NIERO; ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2011.
<i>Maytenus ebenifolia</i> Reissek (Chuchuhuasi)	Tratamento de reumatismo, hemorroidas, artrite, resfriados, disenteria, erupções da pele, diurético, bronquite e infecções femininas, relaxante muscular, analgésicos, anticancerígeno, afrodisíaco e tônico estimulante	REVILLA, 2002; MACARI; PORTELA; POHLIT, 2006.
<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex. Reissek (sombra-de-touro)	Antiúlcera, diurético, laxante, antitumoral, digestivo, tratamento de feridas, antisséptico, antiasmático, analgésicos, anticancerígeno e anti-inflamatório	JORGE et al., 2004; VELLOSA et al., 2006; PESSUTO et al., 2009; SANTOS-OLIVEIRA; COULAUD-CUNHA; COLAÇO, 2009; NIERO; ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2011;
<i>Maytenus guianensis</i> Reissek. (Chichuá)	Tratamento de reumatismo, hemorroidas, artrite, resfriados, disenteria, erupções da pele, diurético, bronquite e infecções	REVILLA, 2002; BORRÁS, 2003; MACARI; PORTELA; POHLIT, 2006; HURTADO, 2013; MENEGUETTI, 2015.
<i>Maytenus obtusifolia</i> Mart. (erva-cancerosa)	Antiúlcera, ansiolíticos, antitumoral e anti-inflamatório	MOTA et al., 2008; NIERO; ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2011.
<i>Maytenus rigida</i> Mart. (chapéu de couro)	Analgésico, anti-infeccioso e anti-inflamatório	MOTA et al., 2008; NIERO; ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2011.
<i>Maytenus robusta</i> Reissek. (coração-de-bugre)	Antiúlcera	MOTA et al., 2008; NIERO; ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2011.
<i>Maytenus salicifolia</i> Reissek. (espinho-de-deus)	Antialérgico e alívio de coceiras	VALLADÃO et al., 2009; NIERO; ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2011

Fonte: Adaptado de Niero; Andrade; Cechinel-Filho (2011)

Nota: Espécies medicinais pertencentes à família Celastraceae

Na região Norte são descritas 11 espécies endêmicas: *M. ebenifolia*, *M. floribunda*, *M. gonaclada*, *M. guianensis*, *M. laevis*, *M. laurina*, *M. sapotiformis*, *M. myrsinoides*, *M. oblongata*, *M. obtusifolia* e *M. sprucei* (LOMBARDI; GROppo; BIRAL, 2015).

Dentre as espécies encontradas nesta região, sete já foram estudadas fitoquimicamente, sendo *M. obtusifolia*, *M. ebenifolia*, *M. floribunda*, *M. gonoclada*, *M. myrsinoides*, *M. laevis* e *M. guianensis*, tendo sido isolado diversos metabólitos secundários (NAKAGAWA et al., 2004; MACARI; PORTELA; POHLIT, 2006; DA SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2009; HURTADO, 2013; MENEGUETTI, 2015; LIMA et al., 2016a).

2.7 ESPÉCIE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH ex REISSEK

Maytenus guianensis é uma árvore de pequeno porte endêmica de terra firme na Amazônia, sendo conhecida popularmente como chichuá, xixuá, chuchahuasi, chucchu huashu, chuchuasi, chuchasha e tonipulmon (DUKE; VÁSQUEZ, 1994; REVILLA, 2002).

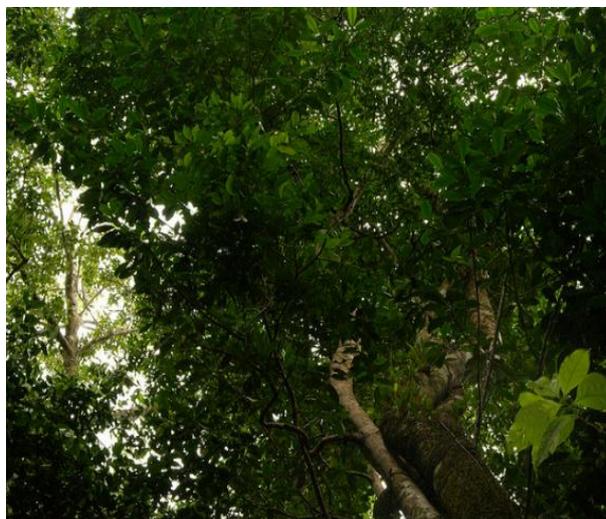
Suas folhas são oblongas lanceoladas ou elípticas, inteiras, acuminadas, coriáceas e lustrosas na face superior, de 10-20 cm de comprimento e 3-4 cm de largura, cartácea, veia central proeminente em ambas as faces, secundárias inconspícuas; ápice acuminado a cuspiado com pecíolo de 4 mm de largura, inflorescência axilar, flores numerosas, pentâmeras diminutas, cálice colorido com dentes decíduos e pétalas obovadas de cor branca, o fruto em forma de cápsula ovoide, sementes oblongas com arilo branco (Figura 4) (REVILLA, 2002).

Suas raízes e caule são utilizados como analgésico, anti-inflamatório, afrodisíaco, relaxante muscular, antirreumático e antidiarreico. As folhas da espécie no preparo de chá e pomada também são indicadas no tratamento de artrite, impotência, resfriado, bronquite, hemorroidas, verminoses, lumbago, úlceras externas e usos ginecológicos (BORRÁS, 2003). Como cosmético é utilizado nas erupções cutâneas e previne o câncer de pele (REVILLA, 2002), além disso, é utilizada para ação antiparasitária (MACARI; PORTELA; POHLIT, 2006), demonstrando um grande potencial etnofarmacológico a ser explorado.

Figura 4 - A espécie *Maytenus guianensis*



(a)



(b)



Fonte: Reinaldo Aguilar (2013)

Legenda: Ilustração das partes aéreas (a); folhas (b); o caule (c); raiz e caule (d)

Acredita-se que a provável ação antiparasitária e anticancerígena descrita popularmente dessa espécie, seja devido à presença de terpenoides ocorrentes no gênero *Maytenus* (DA SILVA et al., 2008; SANTOS-OLIVEIRA; COULAND-CUNHA; COLAÇO, 2009; SILVA et al., 2009; NIERO; ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2011; HURTADO, 2013; MENEGUETTI, 2015).

Diversos estudos tem demonstrado o potencial antiparasitário dos terpenoides contra malária (RODRIGUES-GOULART et al., 2004; NATHAN; HISHAM; JAYAKUMAR, 2008; MAYER et al., 2009; SANTOS et al., 2013b; SILVA et al., 2013a), leishmaniose (TELES et al., 2011; BARROS et al., 2013; LIMA, 2014; SILVA et al., 2014b) e tripanossomíase americana (BEZERRA; MENEGUETTI; CAMARGO, 2012), o que estimula a realização de estudos com plantas que contenham esses metabólitos em seus constituintes químicos, principalmente na região amazônica onde a biodiversidade é pouco explorada no contexto fitoterápico e farmacológico.

O chichuá é utilizado contra bronquite e como um regulador de menstruação (REVILLA, 2002). A tintura da casca é utilizada como relaxante muscular, contra artrite e reumatismo. Quando à tintura da casca é adicionado mel de abelha, a mesma é utilizada contra lumbago e como afrodisíaco. O pó da casca torrada é utilizado para combater úlceras externas. Já o chá da casca é muito utilizado contra resfriado, pós-parto, antidiarreico, em banhos de assento contra hemorroidas, inflamação renal e verminoses. A tintura da raiz é usada como analgésico, gripe e bronquite. A decocção dos galhos é utilizada como estimulante e tônico (REVILLA, 2002).

Desta espécie, até o momento, foram estudados o cerne (PINHEIRO, 1990) e a casca (SOUSA et al., 1986; MACARI; PORTELA; POHLIT, 2006; LIMA; VARGAS; POHLIT, 2010) e a entrecasca (HURTADO, 2013). Em sua dissertação de mestrado Pinheiro (1990) realizou o estudo do extrato etanólico do cerne, que resultou no isolamento dos seguintes metabólitos secundários: dulcitol, N-

dimetilserina, β -sitosterol, β -sitostenona, 3,7-dioxo-friedelano, proantocianidia A e 4'-O-metil(-)-epigalocatequina. Sousa et al. (1986) realizaram o estudo do extrato etanólico da raiz e isolaram os alcaloides sesquiterpênicos wilfordina e evonina.

Macari; Portela; Pohlit (2006) realizaram o estudo químico do extrato etanólico da casca da espécie, resultando no isolamento do flavonoide 4-metilepigalocatequina e por fim Hurtado (2013) realizou o estudo fitoquímico de sua entrecasca, onde resultou no isolamento de seis triterpenos pentacíclicos: 3-oxofriedelano, 3 β -hidroxifriedelano, 3-oxo-16 β -hidroxifriedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano, tingenona e tingenina B.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Realizar um estudo fitoquímico e avaliar o potencial dos extratos e das substâncias isoladas das cascas de *M. guianensis* frente a cepas padrão de bactérias ATCC, patogênicas e fungos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Identificar as estruturas das substâncias isoladas do extrato etanólico das cascas de *M. guianensis*.
- Verificar a atividade antibacteriana dos extratos das cascas de *M. guianensis* sobre bactérias ATCC e patogênicas.
- Analisar a atividade antibacteriana das substâncias isoladas das cascas de *M. guianensis* sobre bactérias ATCC e patogênicas.
- Avaliar a atividade antifúngica do extrato etanólico das cascas de *M. guianensis* sobre *C. albicans*.

JUSTIFICATIVA

4. JUSTIFICATIVA

Atualmente, estudos envolvendo micro-organismos se tornou importante nas diversas áreas do conhecimento, apresentando assim grande relevância no que diz respeito à busca por novas formas de diminuir ou acabar com os problemas provocados por eles. Com isso, dois grupos de micro-organismos têm ganhado atenção especial, que são as bactérias e os fungos, devido a sua alta capacidade de causar doenças.

Várias patologias que afetam a saúde pública são de origem microbiana, com isso, nas últimas décadas, muitos antibacterianos e antifúngicos apresentam pouca eficácia no combate às doenças infecciosas, devido principalmente à alta incidência de infecções causadas por bactérias e fungos multirresistentes, tornando-se um desafio para os profissionais da saúde, combater tais infecções (VON EIFF; PETERS; HEILMANN, 2002).

Tem-se observado cientificamente que a prática do uso popular de plantas medicinais com a finalidade de obtenção dos mais variados efeitos medicamentosos, incluindo sua função como antimicrobiano, tem estimulado potencialmente pesquisas que envolvam a flora brasileira com o intuito na formulação de novos antibióticos, uma vez que o uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é uma prática antiga, amplamente utilizada pela população mundial.

Diante disso, a introdução dos antibióticos na terapêutica representa hoje um grande avanço para saúde pública mundial, uma vez que a utilização de forma indiscriminada na prevenção e tratamento de várias doenças permitiu a seleção de bactérias resistentes, onde cada classe de antibacterianos possui mecanismos de ações diferentes, entre eles, a inibição da síntese de peptidoglicanos, proteínas, ácidos nucleicos e metabólitos essenciais, ou até mesmo na mudança da permeabilidade da membrana plasmática. Contudo, muitas bactérias podem apresentar mecanismos de resistência, como os plasmídeos e os transposons, elementos genéticos que fornecem mecanismos adicionais para a modificação genética.

Contudo, a biotecnologia tem procurado também novos meios de cura com base em novos componentes químicos ou princípios ativos de produtos da biodiversidade, no potencial farmacêutico de inúmeras espécies de micro-organismos, plantas e animais, além da busca da medicina preventiva nesses novos produtos da diversidade biológica. Esse segmento de pesquisa científica tem apresentado rápido progresso, com contribuição da biologia molecular, genética, engenharia genética, bioquímica, farmacologia, com descobertas de novos antibióticos, agentes antivirais, vacinas e, até mesmo, com o emprego da nanotecnologia (MINDELL, 2009).

Por ser o maior ecossistema do mundo, a Amazônia é considerada a maior reserva natural de plantas medicinais, estas que possuem em sua composição química, substâncias bioativas, que podem ser importantes como fonte de novos medicamentos no mercado, possibilitando assim sua eficácia como valor terapêutico em doenças causadas por micro-organismos.

Dados da literatura sobre a atividade antibacteriana de extratos vegetais e seus isolados, avaliada frente a micro-organismos sensíveis e resistentes a antibióticos, mostram o grande potencial das plantas para tratamento terapêutico. Neste contexto, o estudo químico e biológico de plantas medicinais vem se tornando cada vez mais essencial em diversas áreas de pesquisa e desenvolvimento e inovação de medicamentos.

O estudo fitoquímico, dentre outras funções, possibilita a validação de plantas medicinais consagradas pela medicina popular e contribui para a determinação de alvos biológicos de importância etno e farmacológica. Com isso, os estudos fitoquímicos contribuem para o esclarecimento das rotas biossintéticas de diversos constituintes, com a finalidade de aperfeiçoar a produção de metabólitos secundários de interesse industrial e aprimorar as técnicas de controle de qualidade de fitoterápicos. Também fornecem novos compostos com atividade biológica ou protótipos para novos fármacos.

O potencial biotecnológico de produtos naturais aliados com a necessidade de novas alternativas para o tratamento de processos infecciosos causados por micro-organismos encontram-se em um importante cenário no contexto atual, visto que o grande desafio dos sistemas de saúde é tratar quadros infecciosos, sobretudo devido à resistência adquirida pelos micro-organismos aos agentes comumente utilizados. Assim, a descoberta do potencial antimicrobiano se faz cada vez mais necessárias, para superar este problema.

Considerando-se a diversidade de substâncias que existem nas plantas medicinais e a possibilidade de se encontrarem novas substâncias em paralelo com as resistências antibacterianas, bem como estudar as plantas amazônicas, este trabalho teve como objetivo realizar um estudo fitoquímico e avaliar o potencial dos extratos e das substâncias isoladas das cascas de *M. guianensis* frente a cepas padrão de bactérias ATCC, patogênicas e fungos.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ESTUDO QUÍMICO

O estudo fitoquímico das cascas de *M. guianensis* foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais (LPQPN) da Universidade Federal de Rondônia (UNIR) em Porto Velho-RO sob a orientação do professor Dr. Valdir Alves Facundo.

5.2 A COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA

A coleta das cascas frescas de *M. guianensis* se deu no mês de fevereiro de 2008 na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada no km 26 da Estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010) em Manaus - AM com as coordenadas geográficas 0°10' S, 67°05' W no período de verão. A identificação botânica foi realizada pelo envio de uma exsicata ao Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), onde se encontra registrada sob o número 188.485 e identificada pelo pesquisador Doutor José Eduardo da Silva Ribeiro (Figura 5).

5.3 ELABORAÇÃO DOS EXTRATOS DAS CASCAS DE *M. guianensis*

As cascas foram devidamente secas em estufa elétrica com circulação de ar FANEM modelo 320-SE em uma temperatura de 50° C por 48 horas para desidratação do material vegetal. Em seguida, foram trituradas em liquidificador para aumentar mais a superfície de contato, e submetidas a três extrações por percolação com clorofórmio (MGCC), acetato de etila (MGCAE), acetona (MGCA), metanol (MGCM) e etanol (MGCE) a temperatura ambiente por três dias (Figura 6), cada, sendo destinados para os testes fitoquímicos (testes qualitativos) baseados em reações de coloração e precipitação dos mesmos seguindo a metodologia de Matos (2009):

5.3.1 Alcaloides

Para realizar o ensaio utilizou-se 2,0 mL do extrato, sendo adicionado 2,0 mL de ácido clorídrico (10 %), onde aqueceu-se essa mistura por 10 minutos em uma temperatura de 50° C. Após o resfriamento, o extrato foi dividido em quantidades iguais em três tubos de ensaios e com auxílio de pipeta de Pasteur adicionaram-se oito gotas dos seguintes reativos de reconhecimento:

Tubo 1 - Reativo de Mayer: observando formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

Tubo 2 - Reativo de Dragendorff: observando formação de precipitado de coloração laranja a vermelho.

Tubo 3 - Reativo de Wagner: observando formação de precipitado de coloração alaranjado.

5.3.2 Glicosídeos Cardiotônicos

A 2,0 mL de solução do extrato foram adicionados 3,0 mL de solução de acetato de chumbo a 10 % e 2,0 mL de água destilada. Aqueceu-se a mistura em banho-maria durante 10 minutos em uma temperatura de 50° C. Em seguida, o extrato foi filtrado com papel de filtro seco e autoclavado, agitado com 10,0 mL de clorofórmio, separando a fase clorofórmica em seis tubos de ensaio. Após a evaporação do clorofórmio, obteve-se a formação de resíduos nos tubos, os quais foram acrescidos dos seguintes reagentes:

Tubo 1: Realizou-se a reação de Salkowski para a determinação de núcleo esteroidal. Coloração variando do amarelo para o roxo é um resultado positivo.

Tubo 2: 1,0 mL de Reativo de Kedde. Coloração rosa ou azul-violeta ao visível indica cardenólidos, os bufadienólidos não reagem. A cor se atenua em poucos minutos.

Tubo 3: Realizou-se a reação de Keller-Kiliani (ácido acético glacial, uma gota de cloreto férrico III a 5 % em metanol e ácido sulfúrico concentrado). Colorações intensas é resultado positivo.

Tubo 4: Realizou-se a reação de Liebermann-Burchard (1,0 mL da amostra/algumas gotas de ácido acético + 3,0 mL anidrido acético/ácido sulfúrico (50:1, v/v). Resultado positivo: coloração verde, azul esverdeado, roxo a azul.

Tubo 5: Realizou-se a reação de Baljet (1,0 mL da amostra/oito gotas de ácido acético + 3,0 mL de clorofórmio). Resultado positivo: coloração laranja, roxo ou vermelho.

Tubo 6: Realizou-se a reação de Raymond (Filtraram-se o extrato e adicionaram-se 2 gotas de solução de cloreto férrico a 10 % + duas gotas de acetato de chumbo a 10 %). Resultado positivo: coloração variando do amarelo ao roxo.

5.3.3 Cumarinas

Em um tubo de ensaio colocou-se 2,0 mL de extrato, tampou-se com papel de filtro impregnado em solução 10 % de NaOH e levou-se a banho-maria por 10 minutos em uma temperatura de 50° C. Removeu-se o papel de filtro e examinou-se sob câmara de luz ultravioleta (UV). A fluorescência amarela ou verde indica a presença de cumarinas.

5.3.4 Flavonoides

Esta pesquisa baseia-se na modificação da estrutura do flavonoide em presença de ácido. Colocou-se em um tubo de ensaio, 2,0 mL do extrato, sendo adicionado duas gotas de acetato de chumbo a 10 %. A presença de um precipitado corado indica positividade da reação.

5.3.5 Taninos

A 2,0 mL do extrato, adicionou-se 10,0 mL de água destilada. Filtraram-se em papel de filtro e adicionaram-se 2 gotas de solução de cloreto férrico a 10 %. Coloração azul indica possível presença de taninos hidrolisáveis, e coloração verde de taninos condensados.

5.3.6 Saponinas

Neste ensaio, a 2,0 mL do extrato foram adicionados 5,0 mL de água destilada. Após resfriamento, agitou-se vigorosamente, deixando em repouso por 20 minutos. Classifica-se a presença de saponinas pela formação de espumas.

5.3.7 Triterpenos

Neste ensaio, a 2,0 mL do extrato foram adicionados 5,0 mL de clorofórmio. Após filtração, o extrato foi dividido em dois tubos de ensaios com quantidades iguais. Em cada um dos tubos realizaram-se as reações de Liebermann-Burchard e Salkowski. Os triterpenos desenvolvem coloração estável e os esteroides desenvolvem coloração mutável com o tempo.

Em paralelo aos testes fitoquímicos, seguiu-se para o isolamento e purificação dos princípios ativos do MGCE.

5.4 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS CASCAS DE *M. guianensis*

5.4.1 Cromatografia de Coluna

O isolamento e purificação dos constituintes químicos do MGCE foram realizados por meio de cromatografia em coluna de vidro, utilizando-se como fase fixa sílica gel MERCK e VETEC (μm 63-200). O comprimento e diâmetro da coluna variaram de acordo com as quantidades de amostras e de sílica utilizadas (Figura 7). Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se cromatoplasmas de gel de sílica 60 (μm 2-25) sobre poliéster T - 6145, Sigma Chemical CO (com indicador de fluorescência de 250 ηm), de marca Carlo Erba.

Os solventes utilizados nas eluições cromatográficas foram: hexano, acetato de etila e metanol, puros ou combinados em gradiente crescente de polaridade sendo coletadas frações em erlenmeyer de 250 mL cada. A evaporação dos solventes foi realizada em evaporador rotativo FISATOM modelo 802A e para quantificar a massa dos extratos e frações foram utilizadas balanças de precisão Mettler AB-260 e Mettler AB-204.

As revelações das substâncias cromatografadas em CCD (Color câmera SAC - 410NDR, Samsung Electronics, Korea) se deram por exposição das cromatoplasmas analíticas à luz ultravioleta (UV), reveladas em comprimento de onda (254 ηm) e posterior pulverização com revelador universal

(mistura de etanol: ácido acético: ácido sulfúrico - 80:10:10 v/v/v), seguido de aquecimento em estufa elétrica (Solab MA035) entre 50-100° C, por aproximadamente cinco minutos (Figura 8).

Os espectros de massas foram obtidos por meio de impacto eletrônico (70 Ev) em um aparelho de GC/MS Hewlett - Packard 5971 usando coluna capilar (30 m x 0,25 mm) dimetilpolisiloxano BD-1, tendo He como gás de arraste e as temperaturas de 250° C no injetor, 200° C no detector e na coluna variando 1°/min entre 35-180° C e 10° C/min no intervalo de 180-250° C (Analytic Jena).

5.5 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES ISOLADOS DAS CASCAS DE *M. guianensis*

A identificação estrutural dos constituintes químicos isolados das cascas de *M. guianensis* foi realizada por meio de métodos espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN-¹H) e carbono-13 (RMN-¹³C), uni e bidimensional. Espectroscopia de Massa (E.M) e espectroscopia na região do Infravermelho (I.V).

Os espectros de absorção na região do Infravermelho foram registrados em Espectrômetros Perkin-Elmer 720, utilizando-se para substâncias sólidas e líquidas pastilhas de KBr e filmes, respectivamente.

Enquanto que nos espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais foram registrados em Espectrômetros Bruker AC - 200 e 500, operando a 200 e 500 MHz para hidrogênio - 1 (RMN ¹H) e 50 e 125 MHz para carbono - ¹³C (RMN ¹³C). As seqüências de pulsos utilizadas nas experiências bidimensionais estão contidas nos programas Bruker XHCORREAU, para correlação heteronuclear de hidrogênio - 1 e carbono - ¹³C a uma ligação a longa distância (¹H x ¹³C - COSY, J_{CH}, n=1, 2 e 3) e COSY - UA, para correlação Homonuclear (¹H x ¹H - COSY).

Nos experimentos unidimensionais de DEPT-UA (ângulo de 135°), os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as multiplicidades dos deslocamentos indicados segundo a convenção: s (singleto), SI (singleto largo), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto), q (quarteto) e m (multipeto).

E os espectros de massa foram obtidos em espectrômetro de massa modelo HP 5971 A, acoplado a cromatógrafo a gás, modelo 5890 A série II (CG/EM), provido de coluna capilar de metilfenil silicone com 25,0 m de comprimento, 0,20 mm de diâmetro, 0,25 μm de espessura de filme interno, utilizando-se um gradiente de temperatura de 4° C/min de 50 a 80° C/min de 180 a 280° C tendo hélio como gás de arraste, sendo a temperatura do injetor de 250° C.

Para as substâncias sólidas utilizou-se espectrômetro de massa VG AutoSpec da Fision Instruments, modelo M, operando em impacto eletrônico 70 eV.

5.6 ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

O estudo da atividade biológica dos extratos e das substâncias isoladas das cascas de *M. guianensis* sobre as bactérias *E. coli* (ATCC 25922), *K. pneumoniae* (ATCC 13883), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 29213), *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (ATCC 25923), bactérias patogênicas *A. baumannii* (ATCC 19606143), *E. faecalis* (ATCC 4083), *E. coli* enterotoxigênica típica (E 234869), *E. coli* enteroagregativa (ATCC 042) *S. arizonae* (UFAM), *S. desenteriae* (ATCC 13313), e o fungo *C. albicans* (ATCC 10231) foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM), em Porto Velho-RO, sob orientação da professora Dra. Najla Benevides Matos.

5.7 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA ANTIBIOGRAMA COM PRODUTOS NATURAIS (POP)

Este procedimento operacional padrão (POP) estabelece critérios e procedimentos adotados pelo Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) cujo objetivo é executar os testes de difusão em ágar com produtos naturais padronizados e verificar o perfil de suscetibilidade dos micro-organismos que incluíram as bactérias ATCC e patogênicas e o fungo *C. albicans*.

5.7.1 Conceito da técnica

Observar o perfil de resistência e sensibilidade de bactérias frente a extratos vegetais e substâncias isoladas de produtos naturais, por meio de halos de inibição de crescimento *in vitro* utilizando ensaio de difusão em ágar segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) com modificações sugeridas por Cursino et al. (2011) e Pieri et al. (2010).

Na superfície do meio de cultura ágar Müller-Hinton, semeou-se com a ajuda de swab embebido com um inóculo anteriormente ajustado na escala de 0,5 McFarland das bactérias *S. aureus*, *S. resistente a meticilina* (MRSA), *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella arizonae*, *E. faecalis*, *S. desenteriae*, *A. baumannii*, *E. coli* enterotoxigênica típica, *E. coli* enteroagregativa e do fungo *C. albicans*. Orifícios de 5 mm foram feitos no meio de cultura e nestes foram acrescidos 40 µL dos controles positivo (Clorafenicol), negativo (DMSO), dos extratos e das substâncias isoladas que difundiu no meio com as concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL.

Com a difusão do produto no ágar, as bactérias e fungo testados puderam apresentar um crescimento inibido ao redor do orifício, formando halos de inibição.

5.7.2 Preparação dos reagentes e insumos

As placas de 90 mm estéreis com o meio ágar LB foram deixadas em temperatura ambiente antes da semeadura.

Foram dispensados 10 mL de ágar LB nas placas de Petri 90 X 15 sendo esta denominada como camada inferior. Após a solidificação desta camada, foram dispensados sobre a camada inferior 15 mL de ágar Müller-Hinton sendo esta denominada como camada superior. Após solidificação do meio, foram realizados orifícios cilíndricos feitos com o uso de ponteiras estéreis de 200 µL, onde manteve-se a equidistância entre os orifícios para evitar zonas de inibição convergentes.

5.7.3. Preparação do inóculo

As bactérias e fungo utilizados no experimento foram provenientes da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia do CEPEM, na qual uma colônia de cada bactéria e de fungo foram isolados com alça bacteriológica, sendo posteriormente inoculadas para crescimento em meio de cultura LB em 24h a 35° C em agitação orbital na incubadora Shaker (MA420). Após o tempo estabelecido, o inóculo foi calibrado de acordo com a escala McFarland de 0,5 para utilização.

5.7.4 Plaqueamento do inóculo

As placas foram inoculadas, no máximo, 15 minutos após a preparação do inóculo. Em seguida, mergulhou-se com swab estéril no tubo do inóculo e depois retirou o excesso pressionando o swab nas paredes internas do tubo de ensaio. Passou o swab em toda superfície do ágar em três direções, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. No final, passou swab na margem da placa de ágar. Posteriormente, as placas ficaram entreabertas por 5 a 15 minutos à temperatura ambiente para que o inóculo fosse completamente absorvido pelo ágar.

5.7.5 Aplicação dos produtos naturais

O número de orifícios no meio de cultura obedeceu-se o POP que foi de no máximo cinco para placas de 90 mm. As soluções foram aplicadas com auxílio de micropipetador de 200 µL, em quantidade que preenchia o orifício (40 µL), sendo diluídas as amostras utilizadas em DMSO. Cloranfenicol a 0,6 mg/mL foram utilizadas como controle positivo, em solução formulada na concentração utilizada nos discos de inibição comerciais padrão para o método de Kirby e Bauer. Enquanto que para as amostras, utilizou-se as concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL. Após a aplicação dos extratos, e das substâncias isoladas das cascas de *M. guianensis*, as placas foram incubadas numa temperatura de 37° C por 24 horas.

5.7.6 Leitura dos halos de inibição

Após o tempo de incubação, verificou-se o crescimento sobre o ágar e se o mesmo apresentava zona de inibição ou não de forma confluenta e uniforme. As leituras dos halos foram medidas em milímetros usando uma régua milimétrica. Os diâmetros dos halos de inibição total foram medidas,

incluindo o diâmetro do orifício. O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento detectável ao Contador de Colônias Digital Modelo CP 600 Plus.

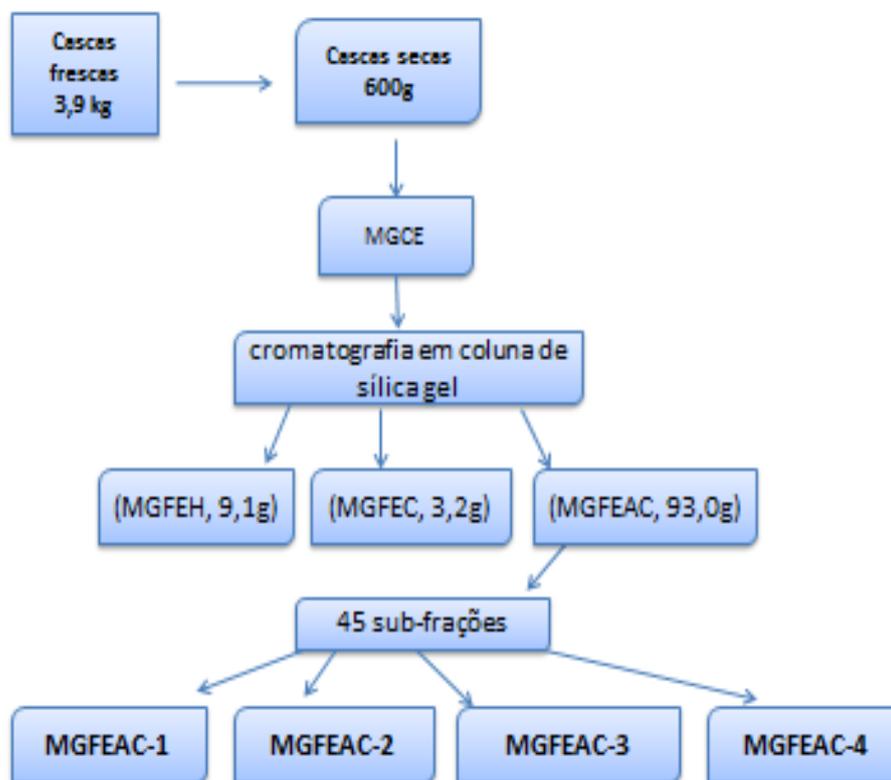
5.7.7 Interpretação dos resultados

Foi considerado como produto inibitório das bactérias e fungos qualquer halo de inibição ao redor dos orifícios. O perfil de sensibilidade dos micro-organismos ao produto testado foi classificado de acordo com a seguinte escala: resistente (ausência de halo de inibição); pouco sensível (halos de até 10 mm de diâmetro); moderadamente sensível (halos entre 10 e 20 mm); muito sensível (halos entre 20 e 30 mm) e severamente sensível (halos acima de 30 mm) (RIBEIRO; SOARES, 2000).

As zonas de inibição obtidas para o controle positivo foram utilizadas para comparação do perfil de sensibilidade bacteriano. Os testes foram feitos em triplicatas e os resultados positivos foram confirmados com uma terceira repetição, em triplicatas e o resultado final foi determinado pela média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição utilizando o software Graphad Prism 5.0.

Figura 9 - Esquema geral do procedimento experimental com *Maytenus guianensis*.

ESTUDO FITOQUÍMICO



Fonte: Renato Abreu Lima (2016)

Nota: Obtenção dos eluatos e frações da cromatografia das cascas de *M. guianensis*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ESTUDO QUÍMICO

O rendimento das cascas frescas foi de 3,9 kg (peso úmido). Após a secagem e a trituração, o rendimento do material foi para 600 g (peso seco). De acordo com a identificação das classes de metabólitos secundários nos diferentes extratos vegetais das cascas de *M. guianensis*, observou-se que os mesmos podem apresentar metabólitos secundários, que de acordo com a literatura científica, são compostos que apresentam e possuem grande interesse na medicina tradicional (Tabela 2):

Tabela 2 - Composição fitoquímica dos extratos vegetais das cascas de *M. guianensis*

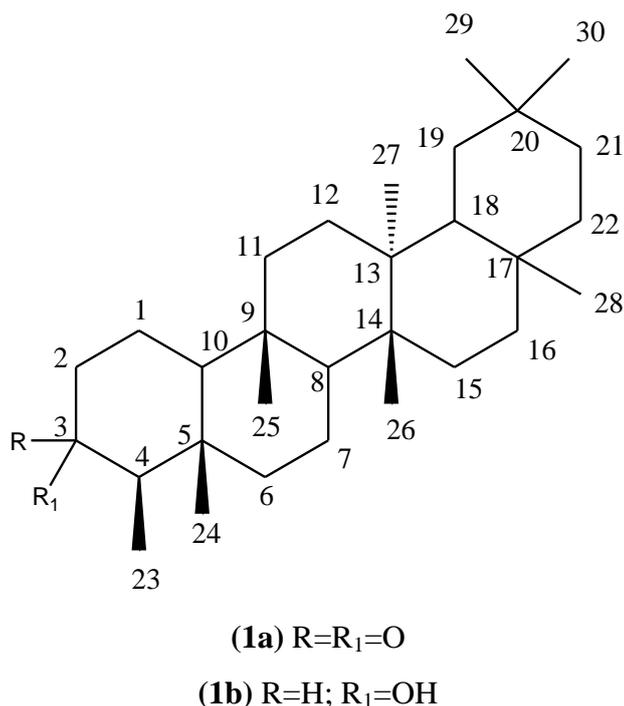
Classes de Metabólitos Secundários	Extratos vegetais				
	MGCC	MGCAE	MGCA	MGCM	MGCE
Alcaloides	-	-	-	-	+
Glicosídeos	-	-	+	-	-
Cardiotônicos					
Cumarinas	-	-	-	+	-
Flavonoides	-	+	-	-	+
Taninos	+	-	-	+	+
Saponinas	-	-	+	-	-
Triterpenos	+	+	+	+	+

Nota: MGCC: Extrato Clorofórmico das Cascas de *M. guianensis*; MGCAE: Extrato de Acetato de Etila das Cascas de *M. guianensis*; MGCA: Extrato Acetônico das Cascas de *M. guianensis*; MGCM: Extrato Metanólico das Cascas de *M. guianensis*; MGCE: Extrato Etanólico das Cascas de *M. guianensis*; (+) Positivo; (-) Negativo

Por ter obtido o maior rendimento de extrato, trabalhou-se com o MGCE e pelos resultados obtidos dos testes fitoquímicos, pela presença de triterpenos, das cascas de *M. guianensis*, o MGCE foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel e eluída com hexano, clorofórmio e acetona como solventes. Após a evaporação dos solventes obteve-se os respectivos eluatos: eluato hexânico (MGCEH, 9,1 g), eluato clorofórmio (MGCEC, 3,2 g) e eluato acetônico (MGCEAC, 93,0 g). O eluato MGCEAC (45,0 g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel com hexano e clorofórmio em polaridade crescentes, obtendo-se desta forma 45 sub-frações.

Repetidas cromatografias levaram ao isolamento de quatro substâncias as quais foram denominadas MGCEAC-1, MGCEAC-2, MGCEAC-3 e MGCEAC-4. O composto denominado MGCEAC-1 apresentou-se como um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio e quando tratado com anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado (teste de Liebermann-Burchard), apresentou coloração vermelha, teste positivo para triterpenos. Todos os dados espectroscópicos de RMN-¹H e RMN-¹³C, uni e bidimensional, E.M. e I.V, revelou tratar-se de uma mistura de dois triterpenos da classe dos friedelanos, já isoladas de outras plantas do gênero *Maytenus* e denominadas friedelina MGCEAC-1a e friedelanol MGCEAC-1b (Figura 10).

Figura 10 - Estrutura dos triterpenos friedelina (1a) e friedelanol (1b)

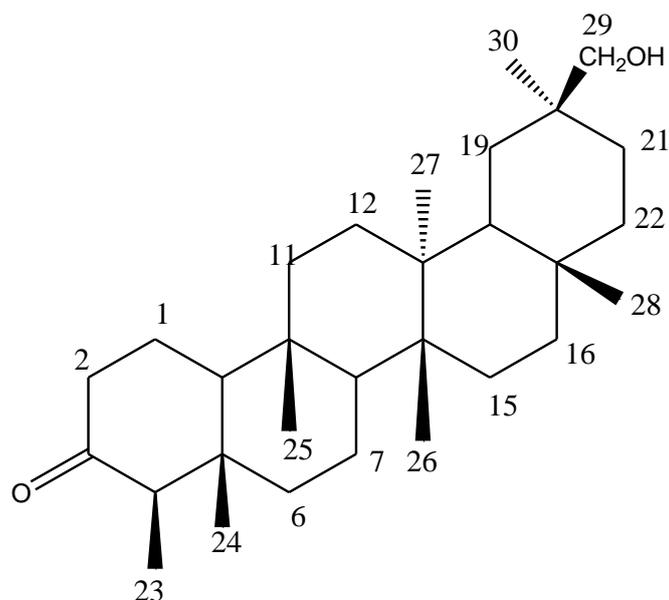


Estudos fitoquímicos realizados em plantas do gênero *Maytenus*, revelaram que estes dois triterpenos podem ser considerados marcadores quimiosistemáticos do gênero (NOSSACK et al., 2000).

Estudos alelopáticos do triterpeno friedelina isolados do capim-marandu (*Brachiaria brizantha* L.) na concentração de 50 mg/mL⁻¹ apontaram uma inibição de germinação de 50 % da planta daninha malícia (*Mimosa pudica* L.) e mata-pasto (*Senna obtusifolia* L.), no que tange o desenvolvimento da radícula como o do hipocótilo das duas espécies de plantas receptoras, embora nem sempre essa superioridade tenha sido estatisticamente diferente ($p > 0,05$) (SANTOS et al., 2008).

O composto MGCEAC-2 apresentou-se como um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio, ponto de fusão 268-269 °C, análise em CCD mostrou uma única mancha e apresentou teste positivo para triterpeno quando tratado com reagente de Liebermann-Burchard. Os dados espectroscópicos de RMN-¹H e RMN-¹³C, uni e bidimensional, E.M. e I.V, revelou tratar-se de um triterpeno pentacíclico da classe dos friedelanos. Trata-se do triterpeno 29-hidroxifriedelan-3-ona (2) (Figura 11), já isolado em outras plantas do gênero *Maytenus*, porém esta é a primeira vez que o mesmo foi isolado das cascas de *M. guianensis*.

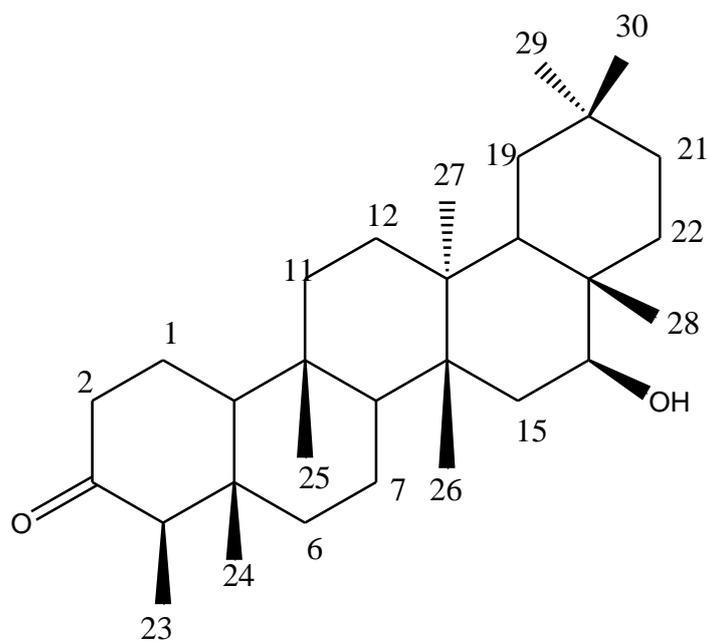
Figura 11 - Estrutura do triterpeno 29-hidroxifriedelan-3-ona



(2)

O composto denominado MGCEAC-3, apresentou-se como um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio, ponto de fusão 278 - 280° C apresentou uma única mancha cromatográfica quando analisado em CCD e apresentou teste positivo para triterpeno quando tratado com reagente de Liebermann-Buerchard. Os dados espectroscópicos de RMN-¹H e RMN-¹³C, uni e bidimensional, E.M. e I.V, revelou tratar-se de um triterpeno pentacíclico da classe dos friedelanos. Trata-se do triterpeno 16-βhidroxifriedelan-3-ona (3) (Figura 12), já isolado em *M. diversifolia* (NOZAKI et al., 1986), porém esta é a primeira vez que o mesmo foi isolado das cascas de *M. guianensis*.

Figura 12 - Estrutura do triterpeno 16β-hidroxifriedelan-3-ona

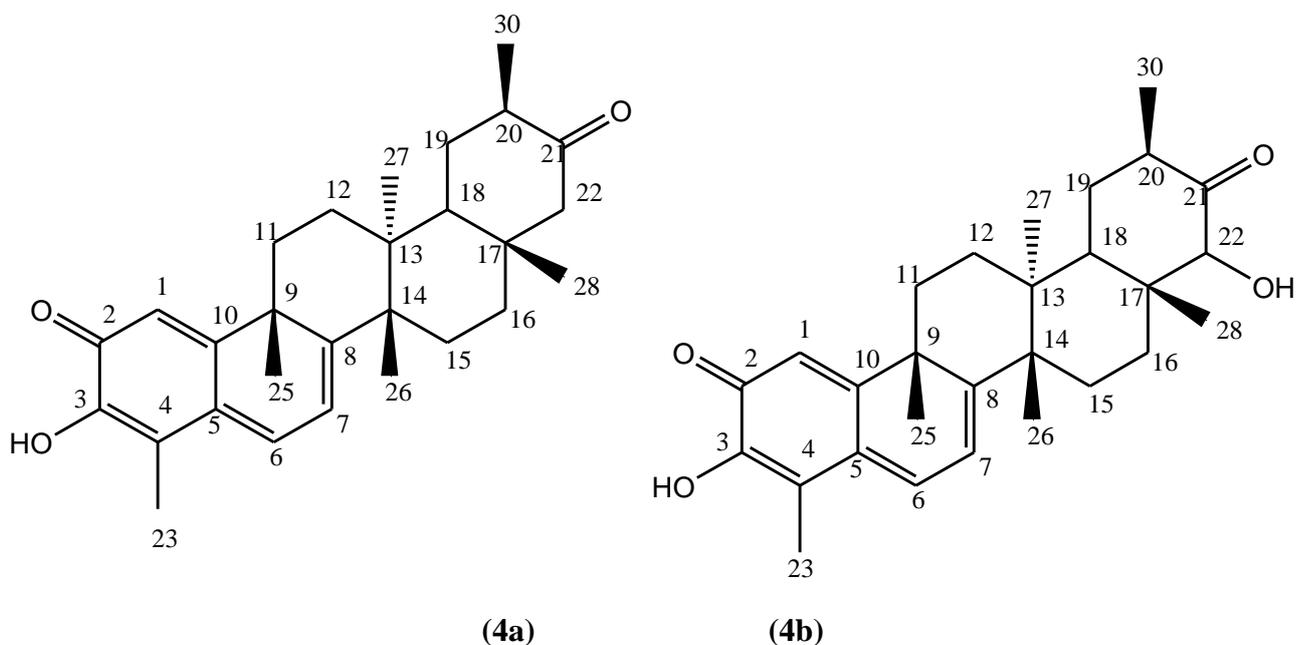


(3)

O composto MGCEAC-4 apresentou-se como cristais amarelos, solúvel em clorofórmio, ponto de fusão (indefinido), análise em cromatografia em camada delgada (CCD) mostrou uma única mancha e apresentou teste positivo para triterpeno quando tratado com reagente de Liebermann-Burchard. Apesar deste composto apresentar somente uma mancha cromatográfica em CCD, os dados espectrais mostraram tratar-se de uma mistura de dois compostos. Estes dados revelaram tratar-se de uma mistura de dois triterpenos quinonametídeos, denominados tingenina B (4a) e tingenona (4b) (Figura 13), isolados de outras plantas do gênero *Maytenus*, porém esta é a primeira vez que foi isolada das cascas de *M. guianensis*. Triterpenos quinonametídeos são metabólitos secundários restritos a espécies da família Celastraceae (CORSINO et al., 2000).

Os espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C, uni e bidimensional, E.M. e I.V. encontram-se nos apêndices.

Figura 13 - Estruturas dos triterpenos quinonametídeos, tingenina B (4a) e tingenona (4b)



Ensaio fitoquímico juntamente com análise de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa do extrato MGCE, mostraram a presença de outros triterpenos quinonaméticos, além da tingenona (4a) e tingenina B (4b). Em etapas seguintes a esta pesquisa novas cromatografias serão realizadas visando o isolamento de outros triterpenos quinonaméticos deste extrato. Foi também observado nestes ensaios a presença de substâncias pertencentes à classe dos flavonoides.

Os triterpenos pentacíclicos são de grande interesse devido às diversas atividades biológicas apresentadas, servindo como candidatos ou protótipos de novos medicamentos (ALVARENGA; FERRO, 2006). Estudos com a friedelina (1a), (Figura 10) indicaram a atividade antiproliferativa, proapoptótica (MARTUCCIELLO et al., 2010), anti-inflamatória, analgésica e antipirética (ANTONISAMY; DURAIANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011) e atividade alopática (SANTOS et al., 2008).

De acordo com trabalhos realizados por Huyke et al. (2006), os triterpenos pentacíclicos são responsáveis pela atividade no tratamento de queratose actínica, uma lesão de pele causada pelo sol que se caracteriza por áreas avermelhadas ou ligeiramente acastanhadas com uma superfície áspera, e isso indica que os triterpenos pentacíclicos são as substâncias responsáveis por esta atividade.

Triterpenos quinonaméticos são compostos de isolamento restrito de plantas da família Celastraceae (CORSINO et al., 2000). Tingenona (4b) (Figura 13) é um triterpeno quinonamético, isolado de várias plantas desta família, entre elas *M. acanthophylla* (OLIVEIRA et al., 2006). Estudos realizados por Silva et al. (2013b), indicam que a Tingenona (4b) possui potente atividade contra *Microcystis novacekii*, uma espécie de cianobactéria que possui alta capacidade de formar florações e

produzir toxinas, denominadas microcistinas, as quais estão envolvidas em acidentes ambientais, e são responsáveis pela maioria dos casos de intoxicação de animais e seres humanos.

Os triterpenos estão distribuídos nos vegetais e atuam para proteger as plantas contra herbívoros e agentes patogênicos, assim como para atrair polinizadores e animais, além disso, possuem grandes potencialidades em atividades biológicas e doenças clínicas, como anti-inflamatórios, antibacterianos, fungicidas, antivirais, antioxidantes, analgésicos, cardiovasculares, antitumorais (IKEDA; MURAKAMI; ORIGASHI, 2008), mostrando assim que nas últimas décadas os triterpenos estão sendo alvos das indústrias farmacêuticas como fontes promissoras de medicamentos preventivos.

Sousa et al. (1986) ao analisarem a constituição química da madeira de *M. guianensis* utilizando como solvente de extração o etanol e a acetona, levaram a identificação das seguintes estruturas: 4'-O-metilepigalocatequina, proantocianidina-A, β -sitosterol e β -sitostenona.

Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas dos metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. Representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (FREITAS et al., 2004).

Estes resultados são indicativos de que variáveis locais, tais como: microclima, insolação, condições nutricionais do solo, posição e idade das estruturas vegetais, variabilidade genética dentro das populações, podem ter grande influência na composição dos princípios ativos, demonstrando assim, um grande potencial no estudo dessas variáveis para maximizar a produção destes compostos com interesse medicinal e farmacológico.

Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas incluem as substâncias fenólicas e polifenóis, que são: fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas (STERN et al., 1996), taninos (SCALBERT, 1991) e alcaloides (HENRIQUES et al., 2004).

6.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS DE *M. guianensis* SOBRE BACTÉRIAS ATCC

A avaliação da contaminação dos extratos e das substâncias obtidas das cascas de *M. guianensis* realizada previamente aos testes antimicrobianos indicou que estes estavam livres de contaminação por bactérias ou fungos, não ocorrendo desenvolvimento de outras colônias nos meios ágar e LB após a incubação. Estes resultados revelaram que os extratos e as substâncias utilizadas apresentaram boas condições microbiológicas no presente trabalho.

Com base nos resultados obtidos pelo POP, verificou-se que o MGCC, MGCA e MGCM apresentaram potencial inibitório de crescimento para *S. aureus* (Tabela 3) e MRSA (Tabela 4) observando-se halos de inibição de crescimento nas concentrações testadas. Não apresentando perfil de sensibilidade para *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli*.

Comparando as tabelas 3 e 4 observa-se que as concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL dos extratos utilizados obtiveram resultados positivos quando comparado ao controle positivo (cloranfenicol) mostrando halos de inibição apresentando 6 mm e de 12 mm para as bactérias *S. aureus* e MRSA e que de acordo com o POP específico, o perfil de sensibilidade das bactérias foi pouco sensível e moderadamente sensível (Figura 14).

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana dos diferentes extratos de *M. guianensis*

Amostras	Concentração (µg/mL)			
	1000	500	250	125
MGCC	12	12	6	10
MGCAE	12	10	10	6
MGCA	8	10	10	12
MGCM	10	10	10	8
MGCE	10	8	10	10
C. POSITIVO	30	30	30	30
C. NEGATIVO	0	0	0	0

Nota: Resultados da média do crescimento (mm) acompanhados de média; inibição de crescimento em mm; Controle positivo: Cloranfenicol; Controle negativo: DMSO

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana dos diferentes extratos de *M. guianensis*

Amostras	Concentração (µg/mL)			
	1000	500	250	125
MGCC	12	12	10	10
MGCAE	6	10	10	12
MGCA	10	12	10	6
MGCM	6	8	10	10
MGCE	10	6	8	8

C. POSITIVO	30	30	30	30
C. NEGATIVO	0	0	0	0

Nota: Resultados da média do crescimento (mm); inibição de crescimento em mm; Controle positivo: Clorafenicol; Controle negativo: DMSO

Matte; Deak; Mata (2015) ao realizar a triagem fitoquímica e avaliar a atividade antibacteriana de extratos aquoso e etanólico das flores de *Sambucus nigra* L. utilizando o método de disco-difusão em ágar nas concentrações de 6, 12, 18 e 24 mg/mL⁻¹, verificaram que os resultados onde as menores concentrações, ou seja, de 6 e 12 mg/mL⁻¹ do extrato aquoso de *S. nigra* apresentaram halos significativos de inibição para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Streptococcus pyogenes*, porém, quando comparado aos medicamentos usados como referência a atividade não foi satisfatória, e, ainda, evidenciou a ausência de inibição para todas as cepas testadas com o aumento da concentração para 18 e 24 mg/mL⁻¹ e com relação a análise da triagem fitoquímica, os autores verificaram a presença de flavonoides com intensa reação de cor no extrato aquoso e etanólico, e de fraca intensidade no extrato acetato de etila.

Outros autores também afirmam utilizarem esta concentração na pesquisa da atividade antimicrobiana de extratos vegetais citando que não houve interferência no crescimento das bactérias testadas (AYRES et al., 2008; ABD-AZIZ et al., 2011; COSTA et al., 2011).

É provável que esta diferença de atividade antimicrobiana esteja relacionada não só a atividade biológica dos extratos testados, mas também devido à presença de uma das estruturas da membrana externa das bactérias Gram-negativas, que pode impedir a passagem de algumas moléculas por meio desta membrana (FRANÇA et al., 2009), além de particularidades relacionadas aos diferentes mecanismos de resistência das linhagens.

Fabri et al. (2011) observaram que o extrato metanólico da camomila apresentou atividade antimicrobiana frente a *P. aeruginosa*, atividade não significativa frente a *S. aureus*, e nenhuma frente a *E. coli* pelo método de susceptibilidade em microdiluição em caldo. Segundo os autores, a prospecção fitoquímica do extrato identificou presença de compostos como triterpenos, fenóis, taninos e flavonoides como possíveis responsáveis pela atividade observada frente a *P. aeruginosa*.

Abdoul-Latif et al. (2011) descreveram atividade antibacteriana do extrato metanólico da camomila frente a *S. aureus*, porém pela técnica de difusão em ágar (16 mm). Esses autores realizaram a extração a partir das folhas secas da camomila. Enquanto que no presente estudo, a extração foi realizada a partir das cascas secas de *M. guianensis*, que apresentam princípios ativos diferentes das folhas, o que poderia justificar a diferença da atividade biológica frente a *S. aureus*.

6.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *M. guianensis* SOBRE BACTÉRIAS ATCC

Na tabela 5 observa-se que a concentração de 125 µg/mL das substâncias utilizadas obteve os melhores resultados quando comparado ao controle positivo (cloranfenicol) mostrando halos de inibição que variaram de 18 a 24 mm para as bactérias testadas e que de acordo com o POP específico o perfil de sensibilidade das bactérias foi moderadamente sensível, demonstrando a atividade do triterpeno 16β-hidroxifriedelan-3-ona.

Tabela 5 - Atividade antimicrobiana das substâncias de *M. guianensis* sobre *S. aureus*

Amostras	Concentração (µg/mL)			
	1000	500	250	125
MGFEAC-1	18	12	16	18
MGFEAC-2	12	12	13	14
MGFEAC-3	24	14	24	24
MGFEAC-4	18	18	18	18
C. POSITIVO	30	30	30	30
C. NEGATIVO	0	0	0	0

Nota: Atividade biológica das substâncias isoladas de *M. guianensis* em diferentes concentrações sobre *S. aureus*; Resultados da média do crescimento (mm); inibição de crescimento em mm; Controle positivo: Cloranfenicol; Controle negativo: DMSO

Na tabela 6 observa-se que a concentração de 125 µg/mL obteve os melhores resultados quando comparado ao controle positivo (cloranfenicol) mostrando halos de inibição que variaram de 12 a 16 mm para as bactérias testadas e que de acordo com o POP específico o perfil de sensibilidade das bactérias foi pouco sensível demonstrando que o triterpeno 16β-hidroxifriedelan-3-ona e triterpenos quinonametídeos, tingenina B (4a) e tingenona (4b) apresentaram atividade antimicrobiana.

Tabela 6 - Atividade antimicrobiana das substâncias de *M. guianensis* sobre MRSA

Amostras	Concentração (µg/mL)			
	1000	500	250	125
MGFEAC-1	11	12	10	13
MGFEAC-2	9	10	10	16
MGFEAC-3	12	12	12	12
MGFEAC-4	12	12	12	12
C. POSITIVO	30	30	30	30
C. NEGATIVO	0	0	0	0

Nota: Atividade biológica das substâncias isoladas de *M. guianensis* em diferentes concentrações sobre *S. aureus*; Resultados da média do crescimento (mm); inibição de crescimento em mm; Controle positivo: Cloranfenicol; Controle negativo: DMSO

Na tabela 7 observa-se que a concentração de 125 µg/mL obteve os melhores resultados quando comparado ao controle positivo (cloranfenicol) mostrando halos de inibição que variaram de 12 a 18 mm para as bactérias testadas e que de acordo com o POP específico o perfil de sensibilidade das bactérias foi moderadamente sensível demonstrando que o triterpeno 16β-hidroxifriedelan-3-ona e triterpenos quinonametídeos, tingenina B (4a) e tingenona (4b) apresentaram atividade antimicrobiana.

Tabela 7 - Atividade antimicrobiana das substâncias de *M. guianensis* sobre *P. aeruginosa*

Amostras	Concentração (µg/mL)			
	1000	500	250	125
MGFEAC-1	12	12	12	14
MGFEAC-2	12	12	12	12
MGFEAC-3	18	18	12	18
MGFEAC-4	12	12	13	16
C. POSITIVO	30	30	30	30
C. NEGATIVO	0	0	0	0

Nota: Atividade biológica das substâncias isoladas de *M. guianensis* em diferentes concentrações sobre *S. aureus*; Resultados da média do crescimento (mm); inibição de crescimento em mm; Controle positivo: Clorafenicol; Controle negativo: DMSO

Na tabela 8 observa-se que a concentração de 125µg/mL apresentou o melhor resultado quando comparado ao controle positivo (cloranfenicol) mostrando halos de inibição de aproximadamente 12 a 17 mm para as bactérias testadas e que de acordo com o POP específico foi pouco sensível verificando que os triterpenos friedelina (1a) e friedelanol (1b) e 29-hidroxifriedelan-3-ona foram os mais que apresentaram atividade antimicrobiana.

Tabela 8 - Atividade antimicrobiana das substâncias de *M. guianensis* sobre *P. aeruginosa*

Amostras	Concentração (µg/mL)			
	1000	500	250	125
MGFEAC-1	14	12	12	17
MGFEAC-2	12	12	12	13
MGFEAC-3	12	12	12	12
MGFEAC-4	9	12	12	12
C. POSITIVO	30	30	30	30
C. NEGATIVO	0	0	0	0

Nota: Atividade biológica das substâncias isoladas de *M. guianensis* em diferentes concentrações sobre *S. aureus*; Resultados da média do crescimento (mm); inibição de crescimento em mm; Controle positivo: Clorafenicol; Controle negativo: DMSO

Os triterpenos quinomatídeos tingenona e tingenina B, isolados neste trabalho, são também citados na literatura por apresentarem atividade antibacteriana sobre *S. petenensis* (SETZER et al., 2001), atividade antioxidante (HURTADO, 2013), o que também se confirma nos resultados deste trabalho. Além disso, este isolado apresentou atividade inibitória da aldose redutase, sugerindo seu potencial antidiabético (MORIKAWA et al., 2003).

Uma possível resposta positiva das substâncias testadas sobre as bactérias foi à utilização do DMSO na concentração de 1-2 %, mostrando uma concentração ideal para ser usada nos experimentos, demonstrando o desempenho na dissolução das amostras avaliadas neste teste biológico, bem como facilitou a dispersão do mesmo no meio de cultura, melhorando assim a qualidade dos procedimentos com os extratos e as substâncias testadas das cascas de *M. guianensis* (Figura 15).

Correia et al. (2008) em seu estudo com o extrato bruto de *Geissospermum argenteum* relataram que ocorreu atividade antimicrobiana contra cepas de *P. aeruginosa* na concentração de 20 µg/mL e de 80 µg/mL para *S. aureus* sensível e de 5 µg/mL para *S. aureus* multirresistente.

Como base na atividade antimicrobiana por meio da técnica de difusão em ágar em poços das substâncias isoladas de *M. guianensis*, os resultados aqui apresentados frente a *S. aureus*, MRSA, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* representam mais uma evidência importante para concluir que as plantas são fontes naturais de substâncias antimicrobianas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Annan; Adu; Gbedema (2009) ao utilizar a friedelina, isolada também neste trabalho, isolada do extrato metanólico das raízes de *Paullinia pinnata* L. sobre *S. aureus* e MRSA utilizando o MIC nas concentrações de 128 e 256 µg/mL, onde verificaram atividade antibacteriana na concentração de 256 µg/mL em comparação com o controle positivo usando a tetraciclina que foi de 128 µg/mL, porém os autores sugerem ensaios biológicos visando à toxicidade de diferentes antibióticos com diferentes concentrações.

Tsuchiya et al. (1996) estudando atividades antimicrobianas de flavononas isolados de Leguminosae, contra *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), demonstraram que tais compostos *Sophora exigua* e *Echinosophora koreensis*, mostraram intensa atividade na inibição do crescimento de cepas de MRSA, revelando assim sua utilidade na estratégia terapêutica contra infecções provocadas por micro-organismos.

Ogunnusi; Oso; Dosumu (2013) ao isolarem friedelina e friedelanol do extrato etanólico das folhas de *Euphorbia kamerucica* Pax testaram a atividade antibacteriana frente o crescimento de *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus* nas concentrações de 100, 75 e 50 µg/mL, respectivamente, pela técnica de disco difusão em ágar de poços e verificaram após 24 horas, zonas de inibição de crescimento variando de 9 a 10 mm para *S. aureus* e de 13 a 15 mm para *P. aeruginosa* na concentração de 50 µg/mL. Porém, resultados negativos foram encontrados em *E. coli*, não observando halos de inibição quando comparados com as outras bactérias testadas.

Provavelmente essa resistência de *P. aeruginosa* frente aos extratos e substâncias testadas das cascas de *M. guianensis* deve-se a característica das porinas da parede celular, que controlam a entrada de moléculas estranhas em seu interior. Algumas *P. aeruginosa* podem substituir o oxigênio por nitrato comoceptor final dos elétrons. Este processo de respiração anaeróbica fornece quase tanta energia quanto à respiração aeróbica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Resultados similares foram encontrados por Carvalho et al. (2014) onde não foi observada atividade antimicrobiana em nenhuma concentração dos extratos etanólicos e de ciclohexano de *Matricaria chamomilla* sobre *E. coli*, tanto na técnica de difusão em ágar, como na diluição em caldo.

O fato dos extratos e das substâncias testadas das cascas de *M. guianensis* não apresentarem atividade antimicrobiana frente à *E. coli* não inviabiliza os estudos sobre o potencial efeito antimicrobiano contra outras bactérias testadas, uma vez que outras espécies vegetais (ROCHA et al., 2013; ELLER et al., 2015) comprovadamente, já apresentaram atividade antimicrobiana para estas bactérias observando-se que há variação na sensibilidade para cada tipo de substância utilizada, o que sugere novas concentrações a serem utilizadas e testadas.

Ribeiro; Soares (2000) afirmam que diversos fatores influenciam nos resultados da técnica de difusão em ágar em poços, tais como: a presença de enzimas bacterianas, a composição do meio, a difusão da substância no meio, a densidade do inóculo, o período de incubação, a temperatura e a estabilidade da substância em uso.

Ainda não se sabe qual o mecanismo de ação dessas substâncias sobre as bactérias analisadas, no entanto, sabe-se que substâncias com atividade antimicrobiana podem estar atuando de modo na inibição da síntese proteica, as sínteses da parede celular, degradação da parede celular, biossíntese de ácido fólico, dentre outros (ALMEIDA, 2013).

Apesar destes resultados promissores, convém ressaltar que, como as plantas medicinais são bastante utilizadas pela população, há necessidade de mais estudos (*in vivo*) que visem elucidar os efeitos prejudiciais que podem ocorrer com a interação dos antibióticos e plantas medicinais. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (CANTON; ONOFRE, 2010).

6.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *M. guianensis* SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

De acordo com o experimento realizado nas condições do POP, verificou-se que as substâncias isoladas (MGCEAC-1, MGCEAC-2, MGCEAC-3 e MGCEAC-4) das cascas de *M. guianensis* não apresentaram potencial inibitório de crescimento sobre todas as bactérias patogênicas testadas. Porém,

devem-se ressaltar as atividades antioxidantes, antifúngicas, citotóxicas e antibactericida de *M. guianensis* sobre outros micro-organismos.

A comparação entre os estudos deve ser realizada com distinção, pois se observa que o metabolismo pode ser diferenciado de cada bactéria (ATCC e patogênicas) sobre meios de culturas, o que pode propiciar diferenças nos crescimentos das cepas, as quais também apresentavam composições fenotípicas distintas. É importante ressaltar que poucos estudos acerca da atividade antimicrobiana de extratos e substâncias isoladas de plantas foram encontrados na literatura, caracterizando o presente ensaio como pioneiro a abordar a atividade sobre as bactérias patogênicas.

Entretanto, observa-se que as realizações de testes microbiológicos e farmacológicos complementares tornam-se importantes e relevantes diante da necessidade de se estabelecer o mecanismo de ação dos produtos naturais frente às cepas das bactérias com potencial patogênico.

A parede celular nas bactérias Gram-negativas, aqui testadas, por sua vez é quimicamente mais complexa, com membrana externa composta principalmente por lipopolissacarídeos (LPS) que reveste uma fina camada de peptidoglicano. A membrana externa é permeável a moléculas hidrofílicas menores do que aproximadamente 600 Da, devido à presença de proteínas denominadas porinas (EPAND; EPAND, 2009). A porção de LPS é responsável pela elevada toxigenicidade, bem como, antigenicidade desses micro-organismos (MOLINARO, CAPUTO; AMENDOEIRA, 2009; YOUNT; YEAMAN, 2013).

6.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DE *M. guianensis* SOBRE *C. albicans*

Com relação ao potencial fungicida, verificou-se que o extrato etanólico das cascas de *M. guianensis* apresentou inibição sobre *C. albicans*, notando-se que no final de 120 horas, a média de crescimento das colônias dos fungos utilizando o extrato foi de 1,52 mm; no controle negativo, a média foi de 3,68 mm, enquanto que no controle positivo, a inibição média foi de 2,87 mm utilizando a concentração de 1000 µg/mL (Tabela 9):

Tabela 9 - Média do crescimento (mm) do fungo *C. albicans*

Tratamentos	Horas					
	24	48	72	96	120	Média
Extrato	1,36	1,53	1,53	1,60	1,60	1,52
Controle Positivo	2,66	2,83	2,83	3,03	3,03	2,87
Controle Negativo	2,80	3,42	3,72	3,90	4,60	3,68

Nota: Média do crescimento (mm) do fungo *C. albicans* submetidos à exposição do extrato etanólico das cascas de *M. guianensis in vitro* durante 120 horas; Controle positivo: Clorafenicol; Controle negativo: Etanol

Com base na análise estatística acima, verifica-se que os resultados utilizando o extrato vegetal foi significativa em comparação com a água destilada, notando-se um resultado satisfatório, observando-se também uma diferença em relação a ele, mesmo assim o resultado é promissor visto que foi testado o extrato bruto, sendo indicado estudos futuros com os metabólitos secundários, para uma melhor avaliação sobre *C. albicans*.

Resultados semelhantes foram encontrado por Santos; Lima (2013) ao testar extratos brutos etnólicos das folhas e frutos verdes e maduros de *S. palinacanthum*, observando uma inibição do crescimento da levedura *C.albicans* demonstrando maior espectro inibitório se comparado como o produto químico.

As plantas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversos compostos, sendo que muitos destes estão associados à atividade antifúngica como é o caso de saponinas, terpenos, alcaloides, cumarinas e taninos. No presente trabalho, a interação entre os metabólitos secundários com a inibição do crescimento fúngico, ficou evidenciada (RODRIGUES; LIMA, 2014).

As atividades antimicrobianas foram descritas para triterpenos pentacíclicos, tais como oleananos ursanos e friedelanos lupanos. Especula-se que o mecanismo de ação dos triterpenos é devido a uma ruptura na membrana de micro-organismos celulares. Para isto, o extrato de hexano e três triterpenos-oxofriedelano (1), 3-oxo-12a-hydroxyfriedelano (3), 3,16-dioxofriedelano (5) e 3-oxo-12a, 29-dihydroxyfriedelano (6) de *M. gonoclada* foram testados contra o padrão de duas linhagens de bactérias de *E. coli*, *C. freundii*, *Bacillus cereus* e contra a levedura *C. albicans*, utilizando o teste de difusão em disco (AWANCHIRI et al., 2009).

Malheiros (2008) relatou que o extrato etanólico e a fração clorofórmica de *Eleutherine plicata* tiveram atividade frente à *S. aureus* e o fungo *C. albicans*, não tendo ação para cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa*. Por meio da determinação da CIM o autor verificou que a fração clorofórmica foi mais ativa que o extrato etanólico.

Esforços significativos têm sido dados na busca por compostos de origem natural, semissintética ou sintética que apresentem uma elevada eficácia, que sejam capazes de inibir, em concentrações baixas, processos vitais de uma ou mais espécies de micro-organismos resistentes e que sejam menos susceptíveis ao desenvolvimento de resistência nos micro-organismos alvo (SILVEIRA et al., 2006; KURODA; CAPUTO, 2013).

Apesar do extrato etanólico das cascas de *M. guianensis* mostraram-se com efeito na inibição de crescimento sobre *C. albicans* na concentração de 1000 µg/mL, tem-se a necessidade de se introduzir novas concentrações para um melhor desempenho sobre o micro-organismo testado.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- De acordo com o teste fitoquímico realizado dos extratos das cascas de *M. guianensis*, verificou-se que os reagentes utilizados apontaram a presença de triterpenos.
- Os resultados deste trabalho em conjunto com os dados descritos na literatura, mostram nitidamente que *M. guianensis* é uma rica fonte de triterpenos das classes dos friedelanos e quinonametídeos, que estes são restritos a família Celastraceae.
- Esta é a primeira vez que estas substâncias foram isoladas e identificadas quatro substâncias das cascas de *M. guianensis* que foram: triterpenos friedelina e friedelanol (triterpeno 29-hidroxifriedelan-3-ona, triterpeno 16 β -hidroxifriedelan-3-ona) e triterpenos quinonametídeos (tingenina B e tingenona).
- Notou-se a eficácia dos extratos de *M. guianensis* sobre duas das cinco bactérias ATCC testadas utilizando a técnica de difusão em ágar nas concentrações de 1000, 500, 250 e de 125 $\mu\text{g/mL}$, sendo inéditos os testes antimicrobianos.
- Este trabalho fornece os primeiros relatos de resultados que demonstram a eficácia das substâncias de *M. guianensis* sobre quatro das cinco bactérias ATCC testadas utilizando a técnica de difusão em ágar na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ sendo inéditos os testes antimicrobianos.
- O extrato etanólico das cascas de *M. guianensis* apresentou inibição de crescimento sobre *C. albicans* na concentração 1000 $\mu\text{g/mL}$ sendo inéditos os testes antimicrobianos.
- Porém, resultados negativos foram para as seis bactérias patogênicas testadas utilizando as substâncias isoladas das cascas de *M. guianensis*.
- Deste modo, *M. guianensis* é uma promissora planta para o desenvolvimento de um novo fitoterápico antimicrobiano, e mais estudos devem ser realizados quanto à composição química e entendimento da atividade sobre fatores de virulência das bactérias multirresistentes.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ABD-AZIZ, S.M.; LOW, C.N.; CHAI, L.C.; ABD RAZAK, S.S.N.; SELAMAT, J.; SON, R.; SARKER, M.Z.I.; KHATIB, A. Screening of selected Malaysian plants against several food borne pathogen bacteria. **International Food Research Journal**, v.18, n.3, p.1195-1201, 2011.

ABDOUL-LATIFL, F.M.; MOHAMED, N.; EDOU, P.; ALI, A.A.; DJAMA, S.O.; OBAME, L.C.; BASSOLÉ, I.H.N.; DICKO, M.H. Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and methanol extract of *Matricaria chamomilla* L. from Djibouti. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.9, p.1512-1517, 2011.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.114-140, 2007.

AGUIAR, J.S.; ARAÚJO, R O.; DESTERRO- RODRIGUES, M.; SENA, K.X.; BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.; OLIVEIRA, S.L.; TAVARES, J.F.; SILVA, M.S.; NASCIMENTO, S.C. Antimicrobial, Antiproliferative and Proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from the stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.4, p.4124-4140, 2012.

AHMED, A.S.; ELGORASHI, E.E.; MOODLEY, N.; MCGAW, L.J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J.N. The antimicrobial, antioxidative, antiinflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African *Bauhinia* species used traditionally to treat diarrhoea. **Journal of Ethnopharmacology**, v.143, n.3, p.826-839, 2012.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.678-89, 2006.

ALFONSO, C.; LÓPEZ, M., ARECHAVALA, A.; PERRONE, M.C.; GUELFAND, L.; BIANCH, M. Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance *Candida* Agar. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.27, n.2, p. 90-93, 2010.

ALHO, C.J.R. Importância da biodiversidade para a saúde humana: uma perspectiva ecológica. **Estudos avançados**, v.26, n.74, p.156-164, 2012.

ALMEIDA, A.M.S.; CAVALCANTI, Y.W.; CASTRO, R.D.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a amostras clínicas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.4, p.649-655, 2012.

ALMEIDA, A.M.S. **Características biológicas e antigênicas de *Escherichia coli* com ênfase aos genes de virulência**. 2013. 30f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

ALVARENGA, E.; FERRO, E.A. Bioactive triterpenes and related compounds from Celastraceae. **Studies in Natural Studies in Natural Products Chemistry**, v.33, p.239-242, 2006.

ALVES, P.M.; LEITE, P.H.A.S.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, L.F.; PEREIRA, M.S.V.; HIGINO, J.S.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.192-196, 2006.

ANDRADE, D.; LEOPOLDO, V.C.; HAAS, V.J. Ocorrência de bactérias multirresistentes em um Centro de Terapia Intensiva de Hospital Brasileiro de Emergências. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.18, p.27-33, 2006.

ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.V.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.464-471, 2007.

ANDRADE, J.I.A. **Atividade antibacteriana dos extratos dos frutos de *Coussapoa asperifolia magnifolia* (Trécul) contra *Aeromonas hydrophila* e fracionamento do extrato metanólico**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual do Amazonas, Manaus. 2009.

ANNAN, K.; ADU, F.; GBEDEMA, S.Y. Friedelin: a bacterial resistance modulator from *Paullinia pinnata* L. **Journal of Science and Technology**, v.29, n.1, p.152-159, 2009.

ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. in mouse and rat models. **Journal of Pharmacy and Pharmacological**, v.63, p.1070-1072, 2011.

APPELBAUM, P.C. JACOBS, M.R. Recently approved and investigational antibiotics for treatment of severe infections caused by Gram-positive bacteria. **Current opinion in microbiology**, v.8, p.510-517, 2005.

AWANCHIRI, S. S.; TRINH-VAN-DUFAT, H.; SHIRRI, J. C.; DONGFACK, M. D. J.; NGUENANG, G. M.; BOUTEFNOUCHET, S.; FOMUM, Z. T.; SEGUIN, E.; VERITE, P.; TILLEQUIN, F.; WANDJI, J. Triterpenoids with antimicrobial activity from *Drypetes inaequalis*. **Phytochemistry**, v.70, n.3, p.419-432, 2009.

AYRES, M.C.C.; BRANDÃO, M.S.; VIEIRA JÚNIOR, G.M.; MENOR, J.C.A.S.; B. SILVA, H.B.; SOARES, M.J.S.; CHAVES, M.H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p.90-97, 2008.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. **International y Food Microbiological**, v.61, p.1-10, 2000.

BALUNAS, M.J.; KINGHOM, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, n.5, p. 431-441, 2005.

BARBEDO, L.S.; SGARBI, D.B.G. Candidíase. **Revista Brasileira de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.22, n.1, p.22-38, 2010.

BARBOSA, V.M.F.; WACZUK, E.P.; KAMDEM, J.P.; ABOLAJI, A.O.; LACERDA, S.R.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I.R.A.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; ROCHA, J.B.T.; POSSER, T. Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of Caju (*Anacardium microcarpum*). **Industrial Crops and Products**, v.55, p.280-288, 2014.

BARREIRO, E.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: Fonte potencial para descoberta de fármacos. **Química Nova**, v.32, n.3, p.679-688, 2009.

BARROS, N.B.; MIGLIACCIO, V.; FACUNDO, V.A.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, R.G.; NICOLETE, R.; SILVA-JARDIM, I. Liposomal-lupane system as alternative chemotherapy against

cutaneous leishmaniasis: macrophage as target cell. **Experimental Parasitology**, v.135, n.2, p.337-343, 2013.

BASTOS, F.C.; LOUREIRO, E.C.B. Caracterização da resistência antimicrobiana de amostras de *Shigella* spp. isoladas em Belém, Estado do Pará, Brasil (1990-2000). **Revista Pan-Amazônia Saúde**, v.1, n.4, p.71-74, 2010.

BERNARDS, A.T.; HARINCK, H.I.; DIJKSHOORN, L.; REIJDEN, T.J.; BROEK, P.J. Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. **Infect Control Hospital Epidemiology**, v.25, n.11, p.1002-1004, 2004.

BEZERRA, W.S.; MENEGUETTI, D.U.O.; CAMARGO, L.M.A. A busca de fármacos para tratamento da tripanossomíase americana: 103 anos de negligência. **Saúde**, v.38, n.1, p.9-20, 2012.

BORRÁS, M.R.L. **Plantas da Amazônia**: medicinais ou mágicas - Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa. Manaus: Valer, 322pp. 2003.

BOTSARIS, A. **Cresce o interesse pela fitoterapia**. 2010. Disponível em [http://www.nucleoalquimico.com.br/pdf/artigos/cresce interesse pela fitoterapia.pdf](http://www.nucleoalquimico.com.br/pdf/artigos/cresce%20interesse%20pela%20fitoterapia.pdf). Acesso em 18 ago de 2015.

BRANDÃO, M.G.L.; COSENZA, G.P.; MOREIRA, R.A.; MONTE-MOR, RLM. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.3, p.408-420, 2006.

BRASIL, AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, ANVISA, **Plantas medicinais**. 2013. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 14 mar de 2016.

BUSTILLO-PARDEY, D.E. La comunicación en insectos. Reciben mensajes de las plantas? El caso de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari). **Cenicafé**, v.2, n.2, p.40-64, 2005.

BUTLER, M.S.; BUSS, A.D. Natural products: the future scaffolds for novel antibiotics? **Biochemical Pharmacology**, v.71, p.919-929, 2006.

CALDERON, L.A.; SILVA, L.H.P.; STÁBELI, R.G. Biodiversidade, infraestrutura universitária e burocracia: os desafios da pesquisa bioprospectiva visando o desenvolvimento sustentado da Amazônia Legal. **Revista de Estudos Universitários**, v.36, n.3, p.15-41, 2010.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.2, p.179-189, 2005.

CANTON, M.; ONOFRE, S.B. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.3, p.348-354, 2010.

CARVALHO, M.G. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* (Celastraceae) do Brasil**. 2004. 175f. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo.

CARVALHO-OKANO, R.M.; LEITÃO-FILHO, H.F. O gênero *Maytenus* (Celastraceae) no Brasil extra-amazônico. In: REIS, M.S.; SILVA, S.R. **Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas**. *Maytenus* spp. Ibama, Brasília, 2004.

CARVALHO-OKANO, R. M.; LEITÃO-FILHO, H. F. O gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) no Brasil extra-amazônico. In: **Conservação e uso sustentável de Espinheira Santa**, Volume Único. p.11-51, 2005.

CARVALHO, A.F.; SILVA, D.M.; SILVA, T.R.C.; SCARCELLI, E.; MANHANI, M.R. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.3, p.521-526, 2014.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R. **Contribuição ao estudo de plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2.ed. Belo Horizonte: Visconde do Rio Branco, 2004. 113p.

CASTRO, P.R.C.; SENA, J.P.A.; KLUGE, R.A. **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2005. 254p.

CELOTO, M.I.B.; PAPA, M.F.S.; SACRAMENTO, L.V.S.; CELOTO, F.J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum**, v.30, n.1, p.1-5, 2008.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria**: human isolates final report 2004. Atlanta: Center for Disease Control and Prevention (US), Department of Health and Human Services; 2007.

CEPEDA, J.A.; WHITEHOUSE, T.; COOPER, B.; HAILS, J.; JONES, K.; KWAKU, F.; TAYLOR, L.; SHAW, S. Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two center study. **The Lancet**, v.365, n.9456, p.295-304, 2005.

CHAMPEET, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 4.Ed. Porto Alegre: Artmed, 533p. 2008.

COOK, A.; REID-SMITH, R.; IRWIN, R.; McEWEN, S. A.; VALDIVIESO-GARCIA, A.; RIBBIE, C. Antimicrobial resistance in *Campylobacter*, *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated from retail turkey meat from Southern Ontario, Canada. **Journal of Food Protection**, v.72, p.473-481, 2009.

CORREIA, A.F.; SEGOVIA, J.F.O.; GONÇALVES, M.C.A.; OLIVEIRA, V.L.D.E.; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J.C.T.; KANZAKI, L.T.B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug- resistant bacteria. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.12, p.369-380, 2008.

CORSINO, J.; CARVALHO, P.R.F.; KATO, M.J.; LATORRE, L.R.; OLIVEIRA, O.M.M.F.; ARAÚJO, A.R.; BOLZANI, V.S.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v.55, p.741-748, 2000.

COSTA, J.P.R.; ALMEIDA, A.C.; MARTINS, E.R.; RODRIGUES, M.N; SANTOS, C.A.; MENEZES, I.R. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e do extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. **Biotemas**, v.24, n.4, p.1-6, 2011.

CUNHA, A.S.; CUNHA, M.R. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogênico de resistência às drogas. **Saúde e Ambiente**, v.2, n.1, p.105-114, 2007.

CUNNINGHAM, R.; JENKS, P.; NORTHWOOD, J.; WALLIS, M.; FERGUSON, S.; HUNT, S. Effect on MRSA transmission of rapid PCR testing of patients admitted to critical care. **Journal of Hospital Infection**, v.65, n.1, p.24-28, 2007.

CURSINO, L.M.C.; SANTOS, I.; MARIÚBA, L.A.; JEFFREYS, M.F.; LIMA, N.M.; OLIVEIRA, J.L.; ORLANDI, P.P.; NUNES, C.V. Antibacterial activity of *Minquartia guianensis* extracts and phytochemical evaluation. **Emirates Journal of Food Agriculture**, v.23, n.6, p.505-510, 2011.

DA SILVA, M.S.; SOUSA, D.P.; MEDEIROS, V.M.; FOLLY, M.A.B.; TABARES, J.F.; BARBOSA-FILHO, J. Alkaloids, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. **Biochemical System Ecology**, v.36, n.5, p.500-503, 2008.

DJIPA, C.D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERC, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambo* (L.) Alston (*Myrtaceae*). **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, n.1-2, p.307-313, 2000.

DINIZ, V.W.B.; DANTAS-FILHO, H.A.; MULLER, R.C.S.; FERNANDES, K.G. Classificação multivariada de ervas medicinais da região amazônica e suas infusões de acordo com sua composição mineral. **Química Nova**, v.36, n.2, p.257-261, 2013.

DUARTE, M.R.; DEBUR, M.C. Stem and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. **Fitoterapia**, v.76, n.1, p.41-49, 2005.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência**, v.7, p.1-16, 2006.

DUARTE, L.P.; VIEIRA-FILHO, S.A.; SILVA, G.D.F.; SOUSA, J.R.; PINTO, A.S. Anti-trypanosomal activity of pentacyclic triterpenes isolated from *Austroplenckia populnea* (Celastraceae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.44, n.1, p.109-112, 2006.

DUARTE, L.P.; FIGUEIREDO, R.C.; DE SOUZA, G.F.; SOARES, D.B.S.; RODRIGUES, S.B.V.; SILVA, F.C.; SILVA, G.D.F. Chemical constituents of *Salacia elliptica* (Celastraceae). **Química Nova**, v.33, n.4, p.900-903, 2010.

DUKE, J.A.; VÁSQUEZ, R. **Amazonian ethnobotanical dictionary**. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1994. 114p.

ELLER, S.C.W.S.; FEITOSA, V.A.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P.; CATÃO, R.M.R. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica *in vitro*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.36, n.1, p.131-136, 2015.

EPAND, R.M.; EPAND, R.F. Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1788, p.289-294, 2009.

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

FERREIRA, C.X.M. **Ação antimicrobiana de diferentes medicamentos intracanáis contra isolados endodônticos de *Enterococcus faecalis***. 2010. 88f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia da Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro.

FIGDOR D.; DAVIES, J.K.; SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth, and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. **Oral Microbiology Immunology**, v.18, p.234-239, 2003.

FONSECA, A.P.N.D.; SILVA, G.D.F.; CARVALHO, J.J.; SALAZAR, G.D.C.M.; DUARTE, L.P.; SILVA, R.P.; TAGLIATI, C.A.; ZANI, C.L.; NEVES, T.M.A.; PERES, V.; VIEIRA-FILHO, S.A. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. **Química Nova**, v.30, n.4, p.842-847, 2007.

FORTUNA, J.L. **Pesquisa de *Salmonella* spp. em hambúrguer cru utilizando a metodologia microbiológica convencional, o método Salmosyst e o método de reação em cadeia da polimerase**. 2013. 228f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal Fluminense, 2013.

FRANÇA, H.S.; KUSTER, R.M.; RITO, P.N.; OLIVEIRA, A.P.; TEIXEIRA, L.A.; ROCHA, L. Atividade antibacteriana de floroglucinois e de extrato hexânico de *Hypericum brasiliense* Choisy. **Química Nova**, v.32, p.1103-1106, 2009.

FREITAS, M.S.M.; SOUZA, P.H.; BELLO, O.I.; JAQUES, R.S. Crescimento e produção de fenois totais em carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) D.C.] em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares na presença e na ausência de adubação mineral. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.3, p.30-34, 2004.

FULLÁ, N.; PRADO, V.; DURAN, C.; LAGOS, R.; LEVINE, M.M. Surveillance for antimicrobial resistance profiles among *Shigella* species isolated from a semirural community in the northern administrative area of Santiago, Chile. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.72, n.6, p.851-854, 2005.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A.; KANELLAKOPOULOU, K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? **International of Journal Antimicrobiology Agents**, v.32, n.2, p.106-119, 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.

GOLL, A.S.; FARIA, M.G.I. Resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.5, n.1, p.69-72, 2014.

GOMES, B.P.F.A.; PINHEIRO, E.T.; JACINTO, R.C.; ZAIA, A.A.; FERRAZ, C.C.R.; SOUZA-FILHO, F.J. Microbial Analysis of Canals of Root-filled Teeth with Periapical Lesions Using Polymerase Chain Reaction. **Journal of Endodoty**, v.34, n.5, p.537-540, 2008.

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

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKE, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, p. 13-14, 2004.

GUO, Y.Q.; LI, X.; XU, J.; LI, N.; MENG, D.L.; WANG, J.H. Sesquiterpene esteres from the fruits of *Celastrus orbiculatus*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.52, p.1134-1136, 2004.

HALBERSTEIN, R.A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v.15, p.680-699, 2005.

HENDRY, E.R.; WORTHINGTON, T.; CONWAY, B.R.; LAMBERT, P.A. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.64, n.6, p.1219-1225, 2009.

HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER, R.P.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKE, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFSC, 2004.

HENRIQUES, A.T.; PIRES, C.A.S.; APEL, M.A. Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R.A.; FILHO, V.C. **Química de Produtos Naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Ed. UNIVALI, 2.ed. 319p. 2009.

HOEFFEL, J.L.M.; GONÇALVES, N.M.; FADINI, A.A.B.; SEIXAS, S.R.C. Conhecimento tradicional e uso de plantas medicinais nas APAS'S Cantareira/SP e Fernão Dias/MG. **Revista Vitas**, v.1, n.1, p.1-25, 2011.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. 4.ed. São Carlos: EDUFSCAR, 2003. 152p.

HOU, Y.; CAO, S.; BRODIE, P.; CALLMANDER, M.; RATOVOSON, F.; RANDRIANAIVO, R.; RAKOTOBÉ, E.; RASAMISON, V.E.; RAKOTONANDRASANA, S.; TENDYKE, K.; SUH, E.M.; KINGSTON, D.G.I. Antiproliferative cardenolide glycosides of *Elaeodendron alluadianum* from the Madagascar Rainforest. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v.17, p.2215-2218, 2009.

HURTADO, F.B. **Contribuição ao estudo fitoquímico e biológico da entrecasca da espécie *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek**. 2013. 170f. Doutorado em Biologia Experimental. Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho.

HUYKE, C.; LASZCZYK, M.; SCHEFFLER, A.; ERNST, R.; SCHEMPP, C.M. Treatment of actinic keratoses with birch bark extract: a pilot study. **Journal the Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v.4, p.130-132, 2006.

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.52, p.26-42, 2008.

IUCN, INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES – IUCN. (2010). **The IUCN Red List of Threatened Species**. Gland: IUCN. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/news/srli-plants-press-release>>. Acesso em 20 mar. 2016.

JORGE, R.M.; LEITE, J.P.V.; OLIVEIRA, A.B.; TAGLIATC, C.A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, n.1, p.93-100, 2004.

KAYAOGU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, v.15, n.5, p.308-320, 2004.

KIMURA, E.; ALBIERO, A.L.M.; CUMAN, R.K.N.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; OGA, S.; BERSANI-AMADO, C.A. Effect of *Maytenus aquifolium* extract on the pharmacokinetic and antiinflammatory effectiveness of piroxicam in rats. **Phytomedicine**, v.7, n.2, p.117-121, 2000.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN-JÚNIOR, W.C. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465p.

KOSEK, M.; YORI, P.P.; OLORTEGUI, M.P. Shigellosis update: advancing antibiotic resistance, investment empowered vaccine development, and green bananas. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.23, p.475-480, 2010.

KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D.W.; BAGG, J.; COULTER, W.A.; READY, D.; LEWIS, M.A.O. *In vitro* susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. **Oral Microbiology Immunology**, v.20, p.349-353, 2005.

KURODA, K.; CAPUTO, G.A. Antimicrobial polymers as synthetic mimics of host-defense peptides. **WIREs Nanomed Nanobiotechnol**, v.5, p.49-66, 2013.

LAN, R.; REEVES, P. R.; OCTAVIA, S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. **Infection Genetics and Evolution**, n.9, v.5, p.996-1005, 2009.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M.T.R.L.; GODINHO, R.O.; NOGUEIRA, T.C.M.L. Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKE, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2003.

LIMA, K.C.; FAVA, L.R.G.; SIQUEIRA, J.F.J. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* Biofilms to Some Antimicrobial Medications. **Journal of Endodoty**, v.27, n.10, p.616-619, 2001.

LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J.P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, n.2, p.137-147, 2006.

LIMA, A.L.; OLIVEIRA, P.R.; PAULA, A.P. *Acinetobacter infection*. New England Journal of Medicine, v.358, n.26, p.2846-2847, 2008.

LIMA, G.S. **Estudo da atividade tripanossomicida e leishamanicida de extratos, frações e terpenos de *Croton cajucara* Benth.** 2014. 76f. (Tese) Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LIMA, R.A.; HURTADO, F.B.; MENEGUETTI, D.U.O.; PASSARINI, G.M.; FACUNDO, J.B.; MILITÃO, J.S.L.T.; FACUNDO, V.A. Antifungal activities of extract ethanolic from the barks of *Maytenus guianensis* Klotzsch Ex Reissek on *Candida albicans*. **Biota Amazônia**, v.20, n.6, p.68-72, 2016a.

LIMA, R.A.; HURTADO, F.B.; MENEGUETTI, D.U.O.; FACUNDO, J.B.; MILITÃO, J.S.L.T.; BENEVIDES, N.M.; FACUNDO, V.A. Microbiological evaluation of isolated compounds from the bark of *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae). **Revista Eletrônica de Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.20, n.1, p.594-602, 2016b.

LIN, Y.; MICKEL, A.K.; CHOGLE, S. The Antibacterial Effect of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodoty**, v.29, n.9, p.565-566, 2003.

LINCOPAN, N.; TRABULSI, L.R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: TRABULSI, L.R. (org.). **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

LOMBARDI, J.A.; GROppo, M.; BIRAL, L. **Celastraceae in lista de espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6746>>. Acesso em 27 jan 2015.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v.111, n.9, p.1265-1273, 2003.

LUO, D.Q.; ZHANG, X.; TIAN, X.; LIU, J.K. Insecticidal compounds from *Tripterygium wilfordii* active against *Mythimna separata*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v.59, p.421-426, 2004.

MACARI, P.A.T.; PORTELA, C.N.; POHLIT, A.M. Antioxidant, cytotoxic and UVB-absorbing activity of *Maytenus guianensis* Klotzsch (Celastraceae) bark extracts. **Acta Amazônica**, v.36, n.4, p.513-518, 2006.

MAGALHÃES, C.G.; FERRARI, F.C.; GUIMARÃES, D.A.S.; SILVA, G.D.F.; DUARTE, L.P.; FIGUEIREDO, R.C.; FILHO, S.A.V. *Maytenus salicifolia*: triterpenes isolated from stems and antioxidant property of extracts from aerial parts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.6, p.415-419, 2011.

MAGEE, B.B.; MAGEE, P.T. Recent advances in the genomic analysis of *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.22, p.187-193, 2005.

MAIA, T.F.; DONATO, A.; FRAGA, M.E. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.17, n.1, p.105-116, 2015.

MAJOWICZ, S.E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F.J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S.J.; JONES, T.F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R.M. The global burden of nontyphoidal *Salmonella gastroenteritis*. **Clinical Infectious Diseases**, v.50, n.6, p.882-889, 2010.

MALHEIROS, L.C.S. **Isoleuterol e Isoleuterina: Potenciais marcadores químicos da tintura de *Eleutherine plicata* Herb (Iridaceae) e atividades microbiológicas e antioxidantes.** 2008. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Pará.

MARTINS, A.F.; BARTH, A.F. *Acinetobacter* multirresistente - um desafio para a saúde pública. **Scientia Medica**, v.23, n.1, p.56-62, 2013.

MARTUCCIELLO, S.; BALESTRIERI, M.L.; FELICE, F.; ESTEVAM, C.S.; SANT'ANA, A.E.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Effects of triterpene derivatives from *Maytenus rigida* on VEGF-induced Kaposi's sarcoma cell proliferation. **Chemical Biological Interactions**, v.183, p.450-454, 2010.

MATOS, F.J. **Introdução à fitoquímica experimental.** 3.ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009. 141p.

MATTE, A.K.; DEAK, A.R.; MATA, P.T.G. Triagem fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana de extratos das flores de *Sambucus nigra* L. (Caprifoliaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p.1049-1054, 2015.

MATU, E.N.; VAN STADEN, J. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v.87, p.35-41, 2003.

MAYER, D.C.; BRUCE, M.; KOCHUROVA, O.; STEWART, J.K.; ZHOU, Q. Antimalarial activity of a cis-terpenone. **Malaria Journal**, v.8, n.139, p.1-4, 2009.

MEDEIROS, K.C.; MONTEIRO, J.C.; DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A.; SILVA, B.A.; PIUVEZAM, M.R. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Raddi in inflammatory models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.23-28, 2007.

MELO, J.G.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Native medicinal plants - commercialized in Brazil - priorities for conservation. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.156, n.1, p.567-580, 2009.

MENA-REJÓN, G.J.; PÉREZ-ESPADAS, A.R.; MOO-PUC, R.E.; CEDILLO-RIVERA, R.; BAZZOCCHI, I.L.; JIMÉNEZ-DIAZ, I.A.; QUIJANO, L. Antigiardial activity of triterpenoids from root bark of *Hippocratea excelsa*. **Journal of Natural Products**, v.70, p.863-865, 2007.

MENEGUETTI, D.U.O.; LIMA, R.A.; PAGOTTO, R.; FACUNDO, V.A. Análise citotóxica e mutagênica do extrato aquoso de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazônico. **Ciência e Natura**, v.36, n.3, p.301-309, 2014.

MENEGUETTI, D.U.O. **Análise genotóxica e antiparasitária de extratos e substâncias isoladas de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae), Chichuá (Xixuá) Amazônico**. 2015. 183f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Departamento de Medicina. Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.316-320, 2005.

MINDELL, D.P. Evolution in the everyday world. **Scientific American**, v.300, p.82-89, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60p.

MOHAMED, F.A.; PERWEZ, A. Anti-inflammatory activity and qualitative analyses of different extracts of *Maytenus obscura* (RICH) by high performance thin layer chromatography method. **Asian Pac Journal Tropical Biomedical**, v.4, n.2, p.152-157, 2014.

MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. (Org.) **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 1**. Rio de Janeiro, 2009. 290 p.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. **Química Nova**, v.24, n.2, p.105-111, 2001.

MORIKAWA, T.; KISHI, A.; PONGPIRIYADACHA, M.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Structures of New Friedelane-Type Triterpenes and Eudesmane-Type Sesquiterpene and Aldose

Reductase Inhibitors from *Salacia chinensis*. **Journal of Natural Products**, v.66, n.9, p.1191-1196, 2003.

MORITA, H.; HIRASAWA, Y.; MUTO, A.; YOSHIDA, T.; SEKITAB, S.; SHIROTAB, O. Antimitotic quinoid triterpenes from *Maytenus chuchuhuasca*. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v.18, p.1050-1052, 2008.

MOTA, K.S.L.; PITA, J.C.L.R.; ESTEVAM, E.C.; MEDEIROS, V.M.; TAVARES, J.F.; AGRA, M.F.; DINIZ, M.F.F.M.; SILVA, M.S.; BATISTA, L.M. Evaluation of the toxicity and antiulcerogenic activity of the ethanol extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. **Brazilian Journal Pharmacognosy**, v.18, n.3, p.441-446, 2008.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PTALLER, M.A. **Microbiologia médica**. 4.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.

NAKAGAWA, H.; TKAISHI, Y.; FUJIMOTO, Y.; DUQUE, C.; GARZON, C.; SATO, M.; OKAMOTO, M.; OSHIKAWA, T.; AHMED, S.U. Chemical constituents from the Colombian medicinal plant *Maytenus laevis*. **Journal of Natural Products**, v.67, n.11, p.1919-1924, 2004.

NATHAN, S.S.; HISHAM, A.; JAYAKUMAR, G. Larvicidal and growth inhibition of the malaria vector *Anopheles stephensi* by triterpenes from *Dysoxylum malabaricum* and *Dysoxylum beddomei*. **Fitoterapia**, v.79, n.2, p.106-111, 2008.

NEGRI, M.L.S.; POSSAMAI, J.C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2, p.553-556, 2009.

NIERO, R.; ANDRADE, S.F.; CECHINEL-FILHO, V. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the *Maytenus* genus. **Current Opinion in Pharmacology**, v.17, n.18, p.1851-1871, 2011.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n.4, p.593-656, 2003.

NOSSACK, A.C.; VASCONCELOS, E.C.; VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M.; ROQUE, N.F. Quantitative analysis of triterpenes friedelin and friedelan-3-ol in *Maytenus aquifolium* by HRGC and HT-CGC. **Phytochemical Analysis**, v.11, p.243-246, 2000.

NOZAKI, H.; SUZUKI, H.; RIRAYAMA, T.; KASAI, R.; WU, R.Y.; LEE, K.H. Antitumor triterpenes of *Maytenus diversifolia*. **Phytochemistry**, v.25, n.2, p.479-485, 1986.

NUNES, M.R.C.M.; MAGALHÃES, P.P.; PENNA, F.J.; NUNES, J.M.M.; MENDES, E.N. Diarreia associada a *Shigella* em crianças e sensibilidade a antimicrobianos. **Jornal de Pediatria**, v.88, n.2, p.125-128, 2012.

NUÑEZ, M.J.; REYES, C.P.; JIMÉNEZ, I.A.; MOUJIR, L.; BAZZOCCHI, I.L. Lupane triterpenoids from *Maytenus* species. **Journal of Natural Products**, v.68, n.7, p.1018-1021, 2005.

OGUNNUSI, T.A.; OSO, B.A.; DOSUMU, O.O. Isolation and antibacterial activity of triterpenes from *Euphorbia kamerunica* Pax. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v.4, n.1, p.158-167, 2013.

OLIVEIRA, A.B.; ALMEIDA, E.R.; SILVA-FILHO, A.A. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniaceae brasileiras. **Química Nova**, v.13, n.4, p.302-307, 2005.

OLIVEIRA, D.M.; SILVA, G.D.F.; DUARTE, L.P.; VIEIRA, S.A. Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acantophylla* Reissek, Celastraceae. **Biochemical Systemy Ecology**, v.34, p.661-665, 2006.

OLIVEIRA, C.R.; SEVER, M.A.C.; DE MORAES, M.O.; DE MELO, L.V.; GOMES, A.P.; SILVA, R.L.; DOS SANTOS, M.L. Avaliação citotóxica em três linhagens de células tumorais das frações obtidas da casca do caule de *Salacia crassifolia* (MART). **Revista Ciência Química e Farmácia**, v.41, n.2, p.133-142, 2012.

PALMA, C.M.; PALMA, M.S. Bioprospecção no Brasil: análise crítica de alguns conceitos. **Revista Ciência e Cultura**, v.64, n.3, p.84-90, 2012.

PEIXOTO, J.V.; ROCHA, M.G.; NASCIMENTO, R.T.L.; MOREIRA, V.V.; KASHIWABARA, T.G.B. Candidíase - uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.8, n.2, p.75-82, 2014.

PELEG, A.Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Review**, v.21, n.3, p.538-582, 2008.

PENATTI, M.P.; HOLLANDA, L.M.; NAKAZATO, G.; CAMPOS, T.A.; LANCELLOTTI, M.; ANGELLINI, M.; ROCHA, M.M.; DIAS, S.W. Epidemiological characterization of resistance and PCR typing of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* strains isolated from bacillary dysentery cases in Southeast Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, n.2, p.249-258, 2007.

PERES, L.E.P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, 2004. 10p.

PESSUTO, M.B.; COSTA, I.C.; SOUZA, A.B.; NICOLI, F.M.; MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; HEINRICH, L. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. **Química Nova**, v.30, n.4, p.970-983, 2009.

PHILLIPSON, L.D. Phitochemistry and Pharmacognosy. **Phytochemistry**, v.68, n.22, p.2960-2972, 2007.

PIERI, F.A.; JOSÉ, R.M.; GALVÃO, N.N.; NERO, L.A.; MOREIRA, M.A.S. Antimicrobial activity of autoclaved and non autoclaved copaiba oil on *Listeria monocytogenes*. **Ciência Rural**, v.40, n.8, p.1797-1801, 2010.

PINHEIRO, J.A. **Análise da Constituição Química da Madeira de *Maytenus guianensis* Klotzch**. Dissertação (Mestrado), 1990. 124 f. Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RASKIN, I.; RIPOLL, C. Can an apple a day keep the doctor away? **Pharmaceutical Design Schiphol**, v.10, n.27, p.1-11, 2004.

REVILLA, J. **Apontamentos para a cosmética Amazônica**. SEBRAE-INPA, Manaus, Amazonas, 2002. 445p.

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia prática**: roteiro e manual. São Paulo: Atheneu, 2000.

RIVAS, C.S. Antibióticos, ayer, hoy y mañana? **Revista Química Viva**, v.25, n.2, p.63-77, 2006.

ROCHA, E.A.L.S.S.; CARVALHO, A.V.O.R.; ANDRADE, S.R.A.; MEDEIROS, A.C.; TROVÃO, D.M.B.M.; COSTA, E.M.M.B. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.3, p.351-355, 2013.

RODRIGUES-GOULART, H.; KIMURA, E.A.; PERES, V.J.; COUTO, A.S.; AQUINO-DUARTE, F.A.; KATZIN, A.M. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobiology Agents Chemother**, v.48, n.7, p.2502-2509, 2004.

RODRIGUES, D.P.; LÁZARO, N.S.; REIS, E.M.F. **Manual de procedimentos para diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. 48p.

RODRIGUES, D.V.; LIMA, R.A. Estudo fitoquímico e o efeito do extrato etanólico das folhas de *Solanum grandiflorum* Ruiz sobre *Candida albicans* *in vitro*. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.7, n.2, p.183-189, 2014.

SAKLANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**, v.12, n.3, p.161-171, 2008.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, p. 403-434, 2007.

SANTOS, L.S.; SANTOS, J.C.L.; SOUZA-FILHO, A.P.S.; CORRÊA, M.J.C.; VEIGA, T.A.M.; FREITAS, V.C.M.; FERREIRA, I.C.S.; GONÇALVES, N.S.; SILVA, C.E.; GUILHON, G.M.S.P.

Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas do capim-marandu e duas variações em função do pH. **Planta Daninha**, v.26, n.3, p.531-538, 2008.

SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAND-CUNHA, S.; COLACO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart., Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2, p.650-659, 2009.

SANTOS, V.L.; SOUZA, M.F.V.; BATISTA, L.M.; SILVA, B.A.; LIMA, M.S.; SOUZA, A.M.F.; BARBOSA, F.C.; CATÃO, R.M.R. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.1, p.68-72, 2011.

SANTOS, M.A.; LIMA, R.A. Potencial fungicida do extrato etanólico das folhas de *Solanum acanthodes* Hook sobre *Candida albicans in vitro*. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.6, n.3, p.373-378, 2013.

SANTOS, V.A.F.F.M.; LEITE, K.M.; SIQUEIRA, M.C.; REGASINI, L.O.; MARTINEZ, I.; NOGUEIRA, C.T.; GALUPPO, M.K.; STOLF, B.S.; PEREIRA, A.M.S.; CICARELLI, R.M.B.; FURLAN, M.; GRAMINHA, M.A.S. Antiprotozoal activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, v.18, n.1, p.1053-1062, 2013a.

SANTOS, K.K.A.; ROLÓN, M.; VEGA, C.; ARIAS, A.R.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Atividade leishmanicida *in vitro* de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. **Revista de Ciências Farmacêuticas e Farmácia Básica Aplicada**, v.34, n.1, p.47-50, 2013b.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, n.12, p.3875-3883, 1991.

SEDGLEY, C.M.; NAGEL, A.C.; SHELBURNE, C.E.; CLEWELL, D.B.; APPELBE, O.; MOLANDER, A. Quantative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. **Archives Oral Biology**, v.50, n.6, p.575-583, 2005.

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

SETZER, W.N.; HOLLAND, M.T.; BOZEMAN, C.A.; ROZMUS, G.F.; SETZER, M.C.; MORIARITY, D.M.; REEB, S.; VOGLER, B.; BATES, R.B.; HABER, W.A. Isolation and frontier molecular orbital investigation of bioactive quinone-methide triterpenoids from the bark of *Salacia petenensis*. **Planta Medicinal**, v.67, n.1, p.65-69, 2001.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, M.S.; SOUSA, D.P.; MEDEIROS, V.M.; FOLLY, M.A.B.; TAVARES, J.F.; BARBOSA-FILHO, J. Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. **Biochemical System Ecology**, v.36, n.5, p.500-503, 2008.

SILVA, E.C.C.; CAVALCANTI, B.C.; AMORIM, R.C.; LUCENA, J.F.; QUADROS, D.S.; TADEI, W.P.; MONTENEGRO, R.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; NUNOMURA, R.C.; NUNOMURA, S.M.; MELO, M.R.; ANDRADE-NETO, V.F.; SILVA, L.F.; VIEIRA, P.P.; POHLIT, A.M. Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.1, p.48-56, 2009.

SILVA, F.C.; GUEDES, F.A.F.; FRANCO, M.W.; BARBOSA, F.A.R.; MARRA, C.A.; DUARTE, L.P.; SILVA, G.D.F.; VIEIRA-FILHO, S.A. Algistatic effect of a quinonamethide triterpene on *Microcystis novacekii*. **Journal of Applied Phycology**, v.25, p.1720-1723, 2013a.

SILVA, G.N.; MARIA, N.R.; SCHUCK, D.C.; CRUZ, L.N.; DE MORAES, M.S.; NAKABASHI, M.; GRAEBIN, C.; GOSMANN, G.; GARCIA, C.R.; GNOATTO, S.C. Two series of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in anti-malarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. **Journal of Malaria**, v.12, n.89, p.1-7, 2013b.

SILVA, A.A.; MORAIS, S.M.; FALCÃO, M.J.; VIEIRA, I.G.; RIBEIRO, L.M.; VIANA, S.M.; TEIXEIRA, M.J.; BARRETO, F.S.; CARVALHO, C.A.; CARDOSO, R.P.; ANDRADE-JÚNIOR, H.F. Activity of cycloartane-type triterpenes and sterols isolated from *Musa paradisiaca* fruit peel against *Leishmania infantum chagasi*. **Phytomedicine**, v.21, n.11, p.1419-1423, 2014b.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M.; TERENCE, H. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v.29, n.4, p.844-855, 2006.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENCKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. 1999. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Editora UFRGS/Editora UFSC, Porto Alegre/Florianópolis.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENCKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. 1002 pg. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC/ Editora da UFRGS. 2007.

SOARES, J.J. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels**. Dissertação (Mestrado), 2013. 82f. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana.

SOUSA, J.R.; PINHEIRO, J.A.; RIBEIRO, E.F.; SOUZA, E.; MAIA, G.S. A sesquiterpene evoninoate alkaloid from *Maytenus guianensis*. **Phytochemistry**, v.25, n.7, p.1776-1778, 1986.

SOUSA, G.F.; DUARTE, L.P.; ALCANTARA, A.F.C.; SILVA, G.D.; VIEIRA-FILHO, S.A.; SILVA, R.R.; OLIVEIRA, D.M.; TAKAHASHI, J.A. New triterpenes from *Maytenus robusta*: structural elucidation based on NMR experimental data and theoretical calculations. **Molecules**, v.17, n.11, p.1349-1356, 2012.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado no APG II**. São Paulo: Instituto Plantarum. 703p. 2008.

SPELLBERG, B.; BARTLETT, J.; GILBERT, D. The future of antibiotics and resistance. **The New England Journal of Medicine**, v.368, n.4, p.299-302, 2013.

SPIVEY, A.C.; WESTON, M.; WOODHEAD, S. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. **Chemical Society Review**, v.31, n.1, p.43-59, 2002.

STERN, J.L.; HAGERMAN, A.E.; STEINBERG, P.D.; MASON, P.K. Phlorotannin-protein interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v.22, n.1, p.1877-1899, 1996.

STEVENS, P.F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 7, 2006. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>> Acesso em 15 de out. 2015.

STROHL, W.A.; ROUSE, H.; FISCHER, B.D. **Microbiologia ilustrada**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2004.

TELES, C.B.G.; MOREIRA, L.S.; SILVA, A.A.E.; FACUNDO, V.A.; ZULIANI, J.P.; STÁBELI, R.G.; SILVA-JARDIM, I. Activity of the lupane isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonenses* promastigotes. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.22, n.5, p.936-942, 2011.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Medicine**, v.119, n.1, p.3-10, 2006.

TIBERTI, L.A.; YARIWAKE, J.H.; NDJOKO, K.; NOSTETTMANN, K. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* (Celastraceae). **Journal of Chromatography Analyt Techonology Biomedical Life Scient**, v.846, n.1, p.378-384, 2007.

TIRASCHI, I.N.; CARNOVALE, S.; BENETUCCI, A.; FERNÁNDEZ, N.; KURLAT, I.; FOCCOLI, M.; LASALA, M.B. Brote de candidemia por *Candida albicans* em neonatología. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.24, p.263-267, 2007.

TODER, D.S. *Pseudomonas aeruginosa*: um patógeno ubíquo. In: SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

TORRES-ROMERO, D.; KING-DIAZ, B.; JIMÉNEZ, I.A.; LOTINA-HENNSSEN, B.; BAZZOCCHI, I.L. Sesquiterpenes from *Celastrus vulcanicola* as photosynthetic inhibitors. **Journal of Natural Products**, v.71, p.1331-1335, 2008.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANAGAKI, S.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; INHUMA, M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavonones againts methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.50, n.1, p.27-34, 1996.

VALLADÃO, F.N.; MIRANDA, R.R.; VALE, F.H.; VALLADÃO, S.A.; SILVA, G.D.F.; DUARTE, L.P.; CARVALHO-OKANO, R.M.; MESSIAS, M.C.T.B.; VIEIRA-FILHO, S.A. Four Brazilian

Maytenus salicifolia Reissek (Celastraceae) groups studied by TLC and UV spectrophotometry. **Journal Brazilian Pharmacognosy**, v.19, n.3, p.733-739, 2009.

VEIGA-JÚNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.308-313, 2008.

VELLOSA, J.C.R.; KHALIL, N.M.; FORMENTION, V.A.F.; XIMENES, V.F.; FONSECA, L.M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I.L.; OLIVEIRA, O.M. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* Bark. **Fitoterapia**, v.77, n.3, p.243-244, 2006.

VON EIFF, C.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **Lancet Infect Diseases**, v.2, p.677-685, 2002.

YOUNT, N.Y.; YEAMAN, M.R. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1277, p.127-138, 2013.

YUNES, R.A.; CECHINEL-FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2.ed. Itajaí: UNIVALI, 2011. 319p.

WALSH, F.M.; AMYES, S.G.B. Microbiology and Drug Resistance Mechanisms of Fully Resistant Pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p.439-444, 2004.

WHITSON, E.L.; DAMAYANTHI, M.S.M.V.; VELTRI, C.A.; BUGNI, T.S.; DILIP, S.E.; IRELAND, C.M. Oppositines A and B, sesquiterpenes pyridine alkaloids from a Sri Lankan *Pleurostyliia opposita*. **Journal of Natural Products**, v.69, p.1833-1835, 2006.

WRIGHT, G.D. Bacterial Resistance to Antibiotics: enzymatic degradation an modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.1451-1470, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Formulário de autorização de coleta de material vegetal de *Maytenus guianensis* Klotzsch



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
 MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA - MCT
 INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
 DIVISÃO DE SUPORTE ÀS ESTAÇÕES E RESERVAS - DSER

Formulário de Autorização*

(* Apenas para funcionários do INPA)

Dados Pessoais		Informações Básicas	
Nome: <u>Leda Fabílen Turcina</u>		<input type="checkbox"/> Visita/Aula <input checked="" type="checkbox"/> Coleta/Pesquisa <input type="checkbox"/> Outros	
Profissão/Cargo: <u>Estudante</u>		Período:	
RG/CPF: <u>934283</u>	Telefone(s) Contato: <u>5285-5211</u> <u>ou 99787011</u>	Permanência: <input type="checkbox"/> Pernoite <input type="checkbox"/> Trânsito	
Endereço:		Período das atividades: <input type="checkbox"/> Matutino <input type="checkbox"/> Vespertino <input type="checkbox"/> Noturno	
Origem		Objetivo	
Instituição: <u>Fundação Universidade Federal de PO (UNIFOP)</u>		Extração de folhas e raízes para posterior isolamento de princípio ativos em laboratório.	
Setor: <u>Laboratório de Pesquisa e Estudos de Anal. Nat.</u>			
Projeto: <u>Monoclonia (PCC)</u>			
Relação de Acompanhantes (ou em anexo)		Material da Coleta	
<u>Tratadora dos Lavros Suire da Silva</u> ✓		<u>folhas e raízes e cascas.</u>	
Observações			

Autorizado em 21/08/08
 De acordo,


 Elias Rodrigues
 Chefe de Divisão DSER
 PO 32072004

 Coordenador/Chefe


 Leda Fabílen Turcina
 Solicitante

Responsável
 José Eduardo Lanza da S. Ribeiro
 Chefe-Curador do Herbário do INPA
 PO 071-2004

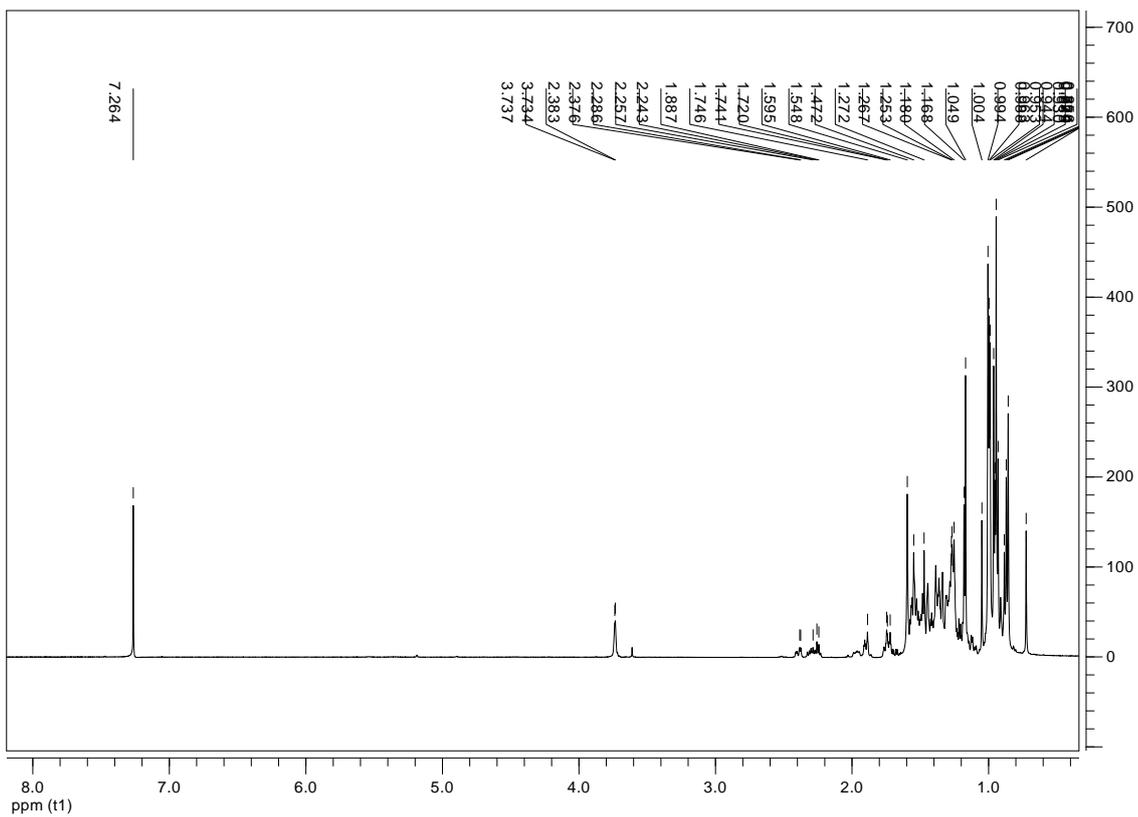
DSER / INPA
 RECEBIDO EM:
21/08/08
 HORA: 04:20
 VISTO: Rafaela

Nota: Formulário de autorização para a coleta das diferentes estruturas botânicas de *Maytenus guianensis* no estado do Amazonas

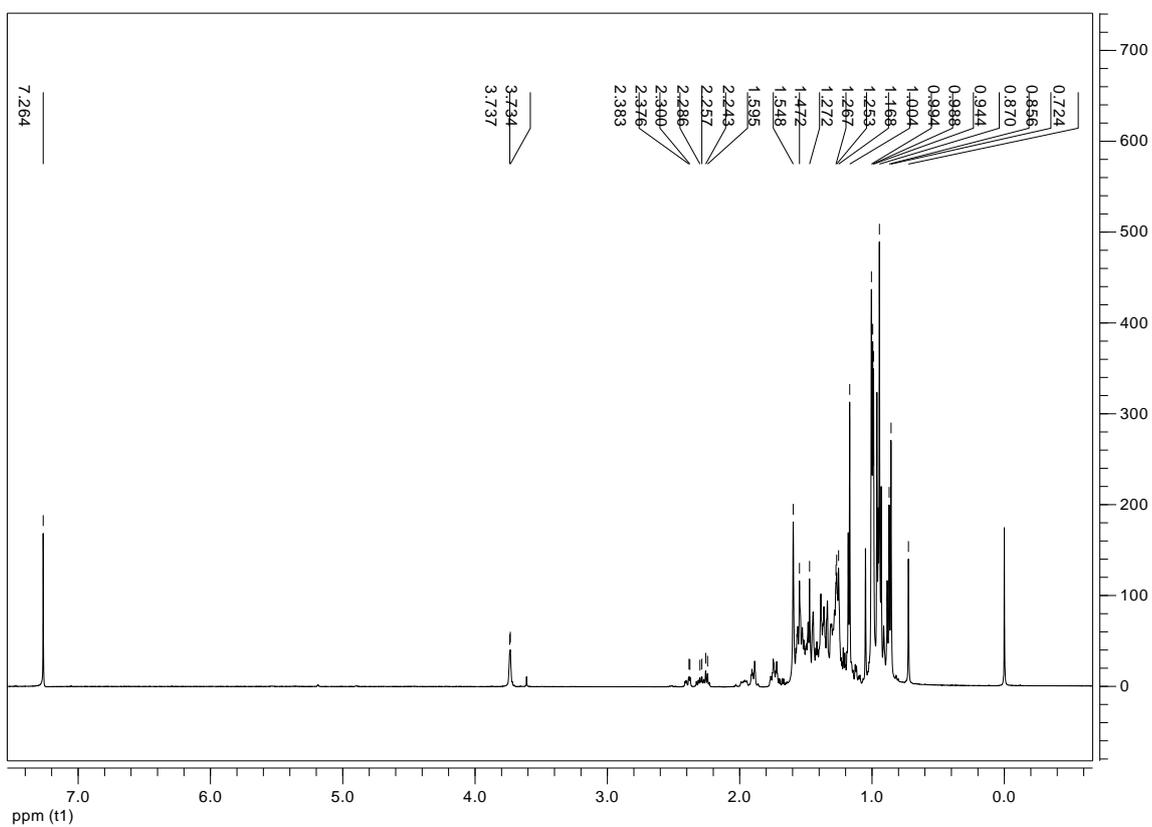
APÊNDICE B - Ficha de registro de identificação botânica de *Maytenus guianensis* Klotzsch Ex Reissek

INPA	INPA	INPA
 HERBÁRIO INPA Manaus-Amazonas-Brasil	 HERBÁRIO INPA Manaus-Amazonas-Brasil	 HERBÁRIO INPA Manaus-Amazonas-Brasil
CELASTRACEAE <i>Maytenus guianensis</i> Klotzsch Brasil, Amazonas, São Gabriel da Cachoeira, Rio Negro, opposite São Gabriel da Cachoeira. 0°10' S, 67°05' W Rio Negro, opposite São Gabriel da Cachoeira. Fruits dark tan. Stevenson, D.W. 1030 & Ramos, J.F. & Mueller, G.	CELASTRACEAE <i>Maytenus guianensis</i> Klotzsch Det.: Brito, J.M. de - Nome vulgar: Chichuá, Chichuá. Brasil, Amazonas, Entrada estrada Petrobrás, mata perturbada. 2°53' S, 59°58' W Entrada estrada Petrobrás, mata perturbada. Árvore de aprox. 13m altura, DAP 20cm. Tronco triangular, reto. Rítidoma quebradiço, fino, externamente cinza e internamte. alaranjado; cicatrizes marrom-claro a marrom. Casca nova marrom a alaranjada, 1mm espess.; casca viva rósea, 4mm espess. Alburno amarelo-creme, oxid. escurecendo; cheiro suave; medula rósea. Floresta de platô, extrato médio, solo argiloso. Frutos imaturos verde-amarronzados, globosos; pedúnculo verde; estigma permanente; polpa com cheiro agradável; semente branca.	CELASTRACEAE <i>Maytenus guianensis</i> Klotzsch Det.: Brito, J.M. de - Nome vulgar: Chichuá, Chichuá. Brasil, Amazonas, Entrada estrada Petrobrás, mata perturbada. 2°53' S, 59°58' W Entrada estrada Petrobrás, mata perturbada. Árvore de aprox. 13m altura, DAP 20cm. Tronco triangular, reto. Rítidoma quebradiço, fino, externamente cinza e internamte. alaranjado; cicatrizes marrom-claro a marrom. Casca nova marrom a alaranjada, 1mm espess.; casca viva rósea, 4mm espess. Alburno amarelo-creme, oxid. escurecendo; cheiro suave; medula rósea. Floresta de platô, extrato médio, solo argiloso. Frutos imaturos verde-amarronzados, globosos; pedúnculo verde; estigma permanente; polpa com cheiro agradável; semente branca.
INPA: 167147	INPA: 188495	INPA: 114
24 novembro 1987	29 setembro 1995	29 setembro 1995
BRAHMS	BRAHMS	BRAHMS

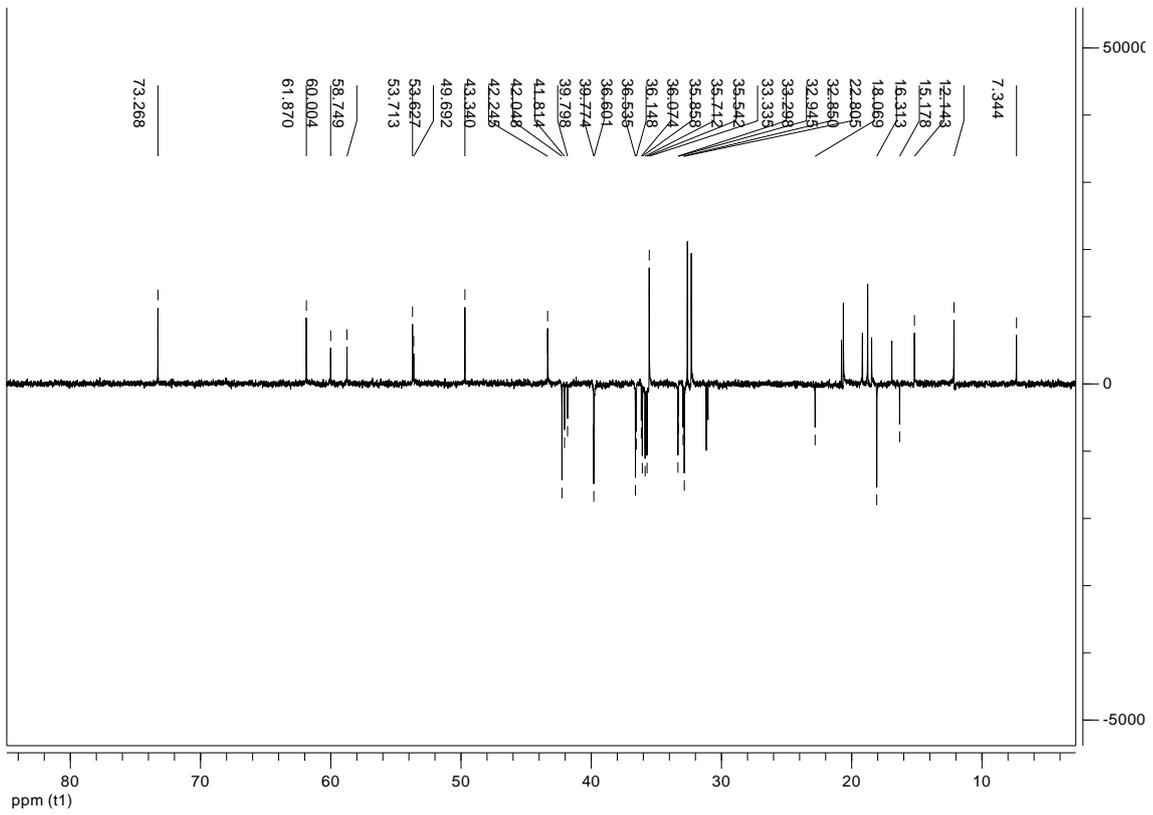
Nota: Ficha de registro de identificação botânica de *Maytenus guianensis* herborizada no INPA



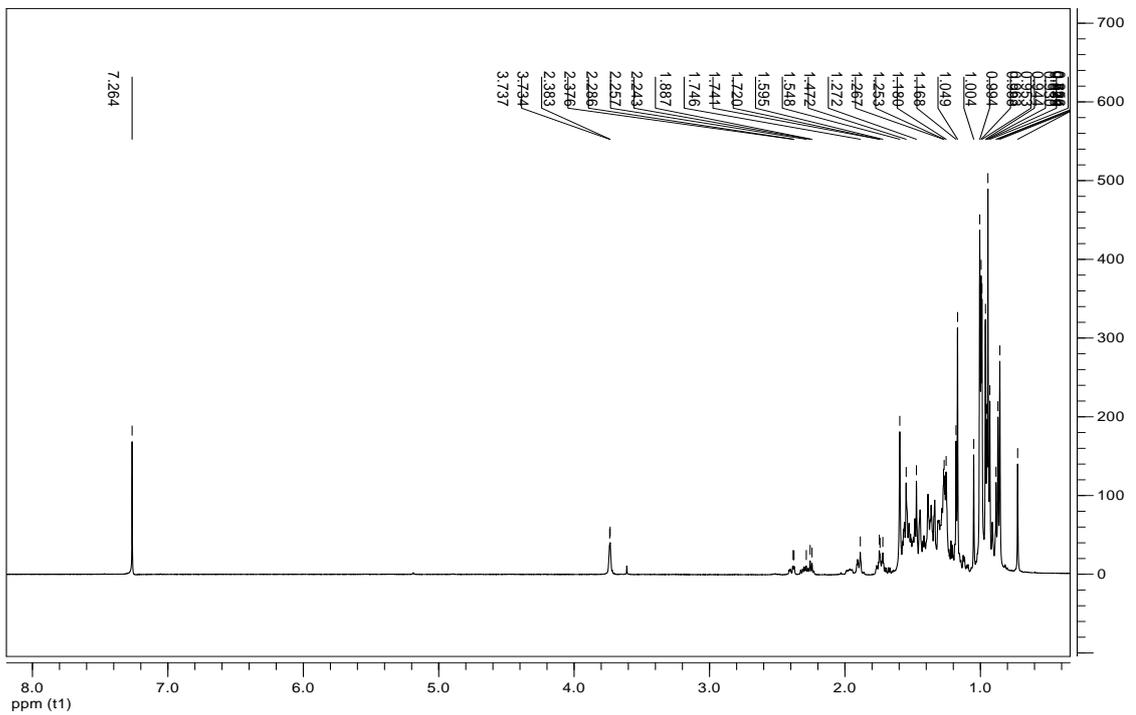
Nota: Espectro de RMN ^1H de MGCEAC-1a e MGCEAC-1b



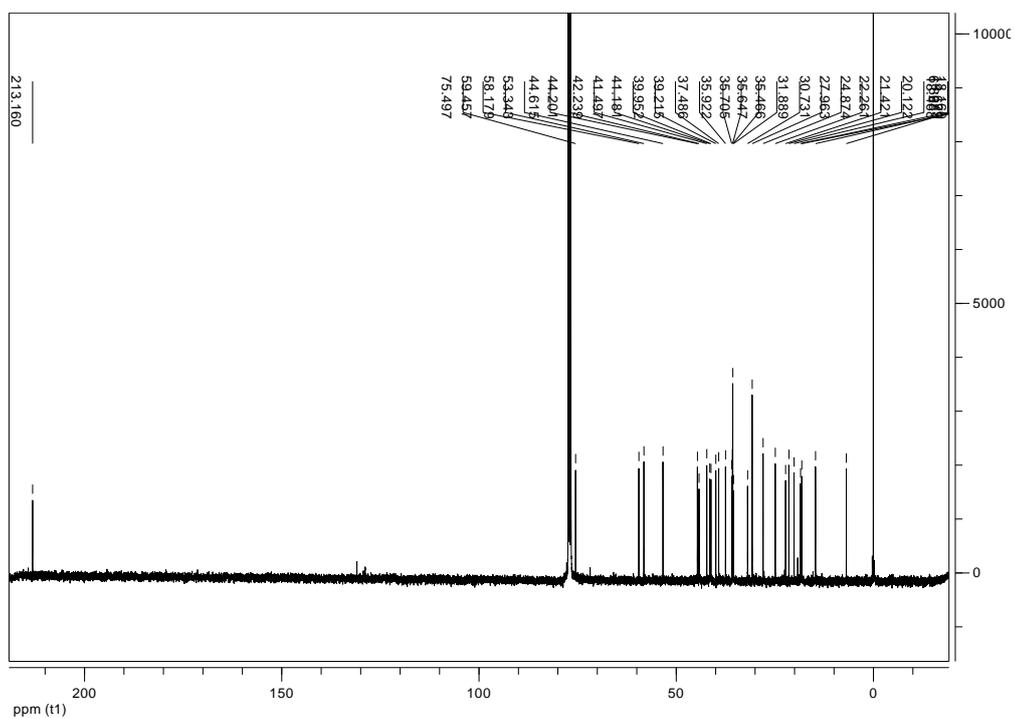
Nota: Espectros de RMN ^1H de MGCEAC-2



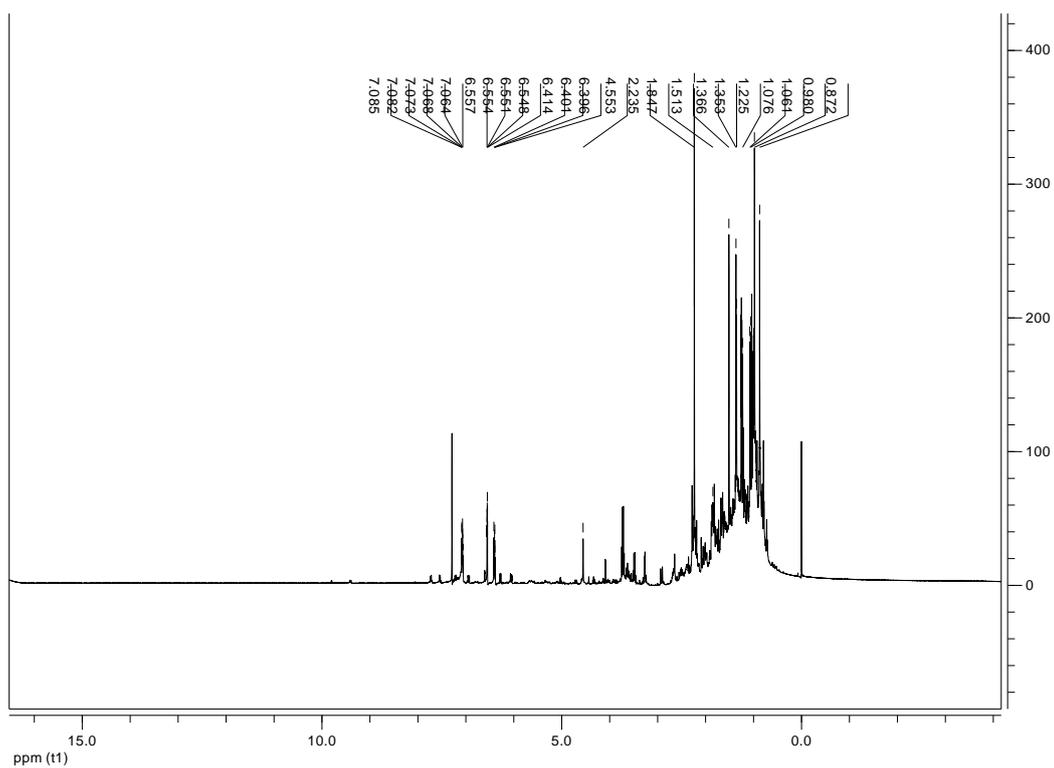
Nota: Espectros de RMN ^{13}C de MGCEAC-2



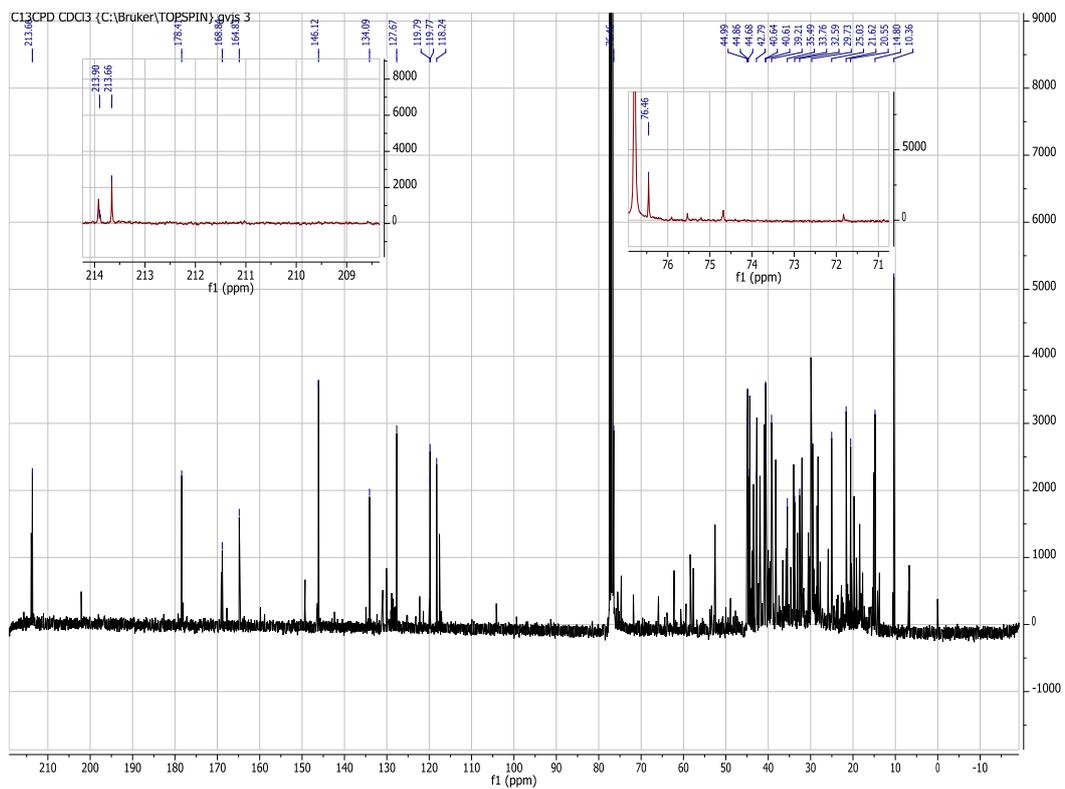
Nota: Espectros de RMN ^1H de MGCEAC-3



Nota: Espectros de RMN ^{13}C de MGCEAC-3

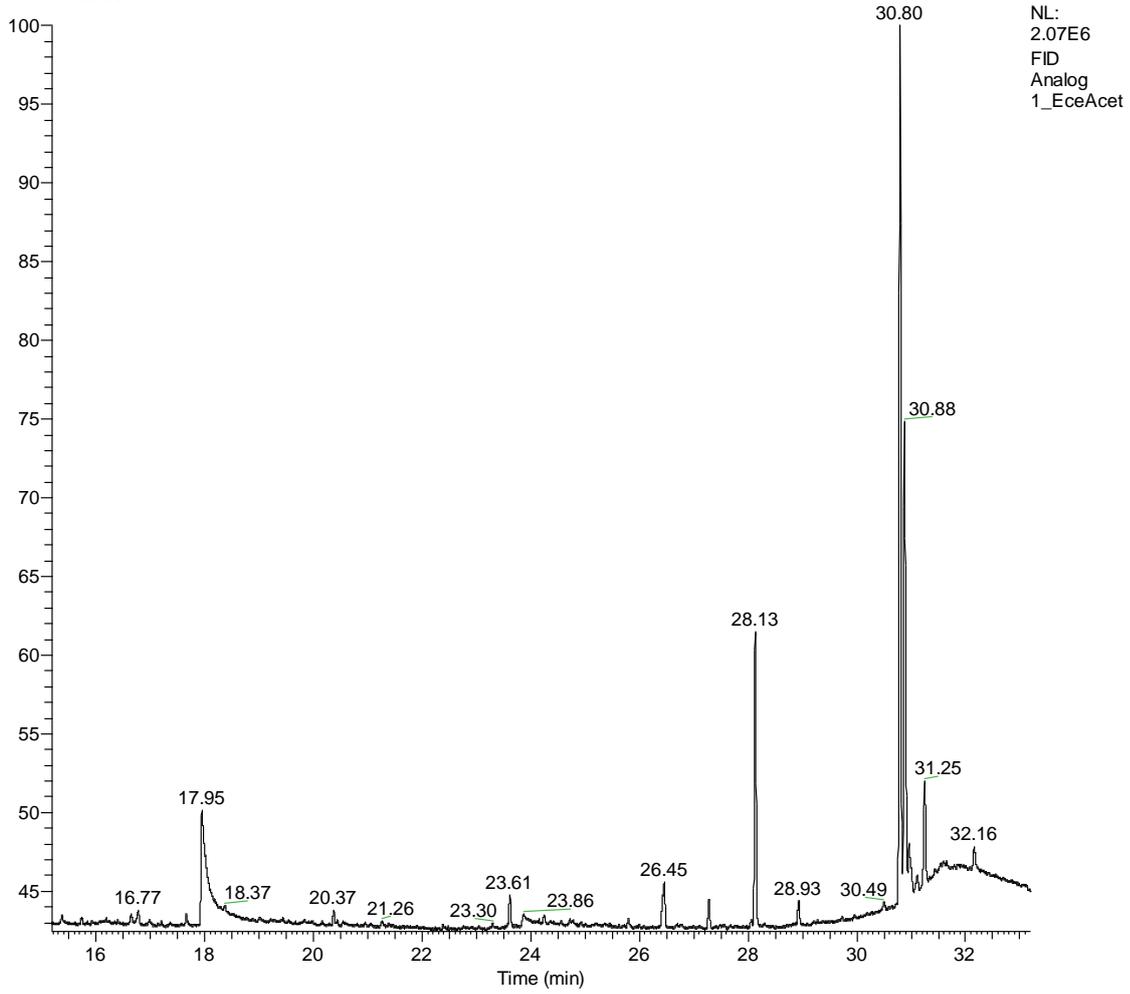


Nota: Espectros de RMN ^1H de MGCEAC-4a e MGCEAC-4b

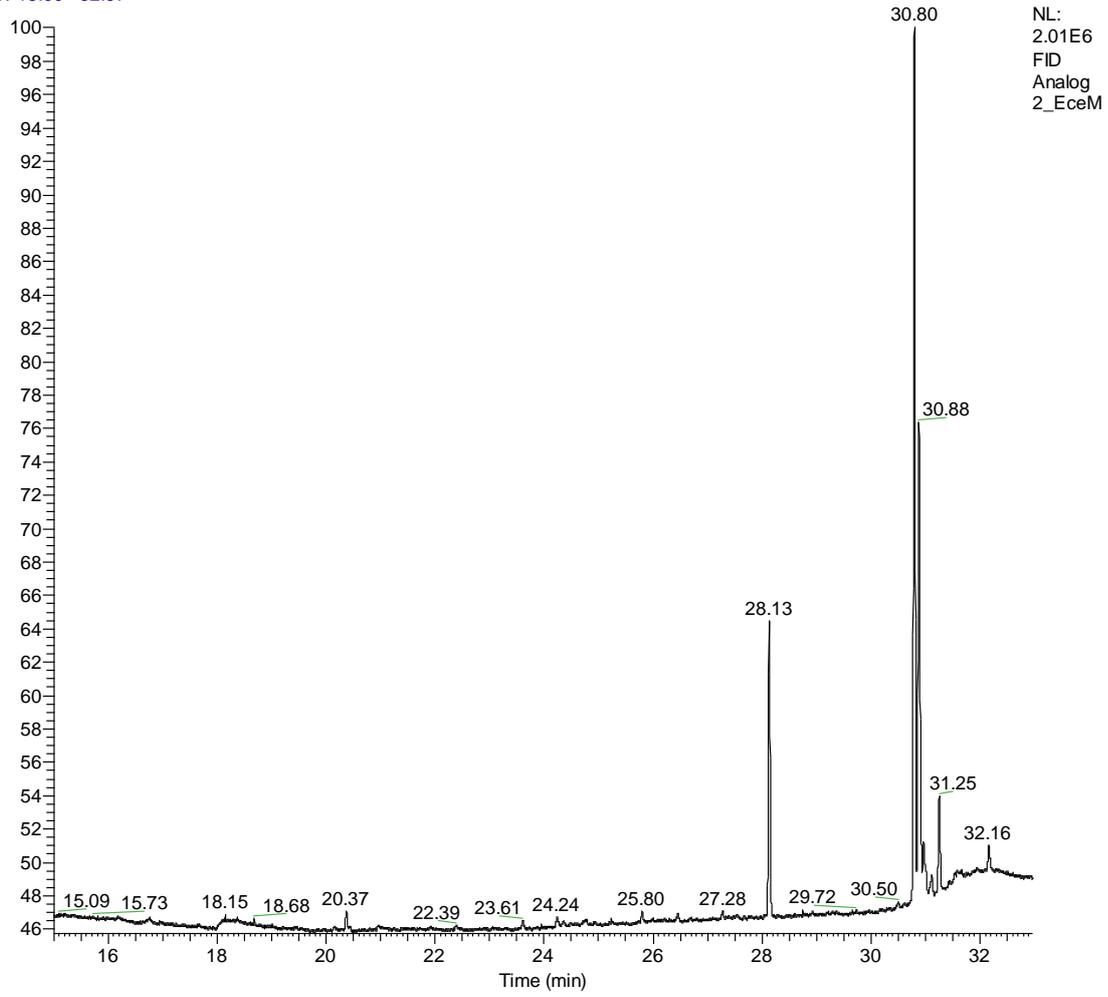


APÊNDICE D - Análise FID de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek

RT: 15.18 - 33.20



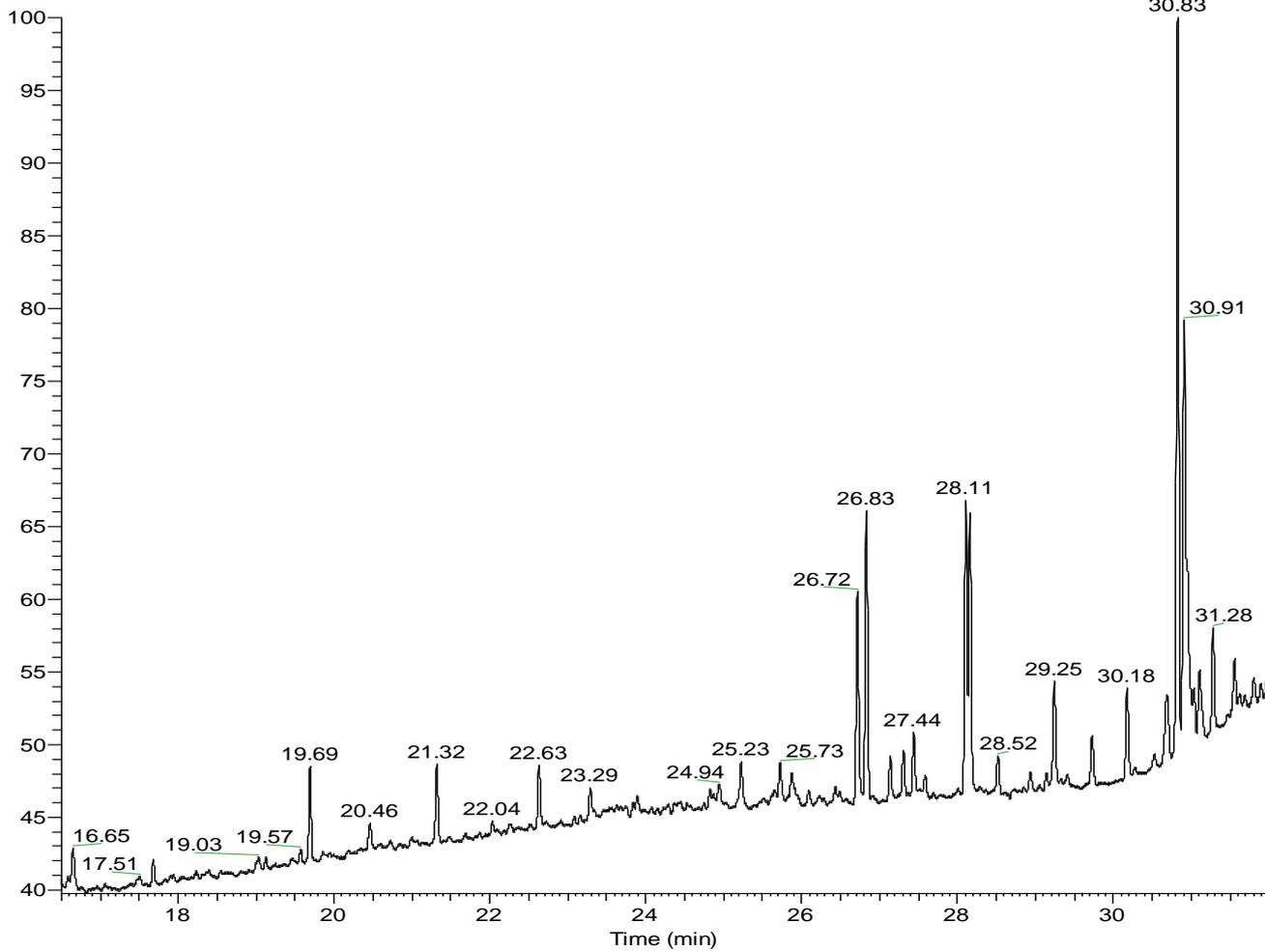
RT: 15.00 - 32.97



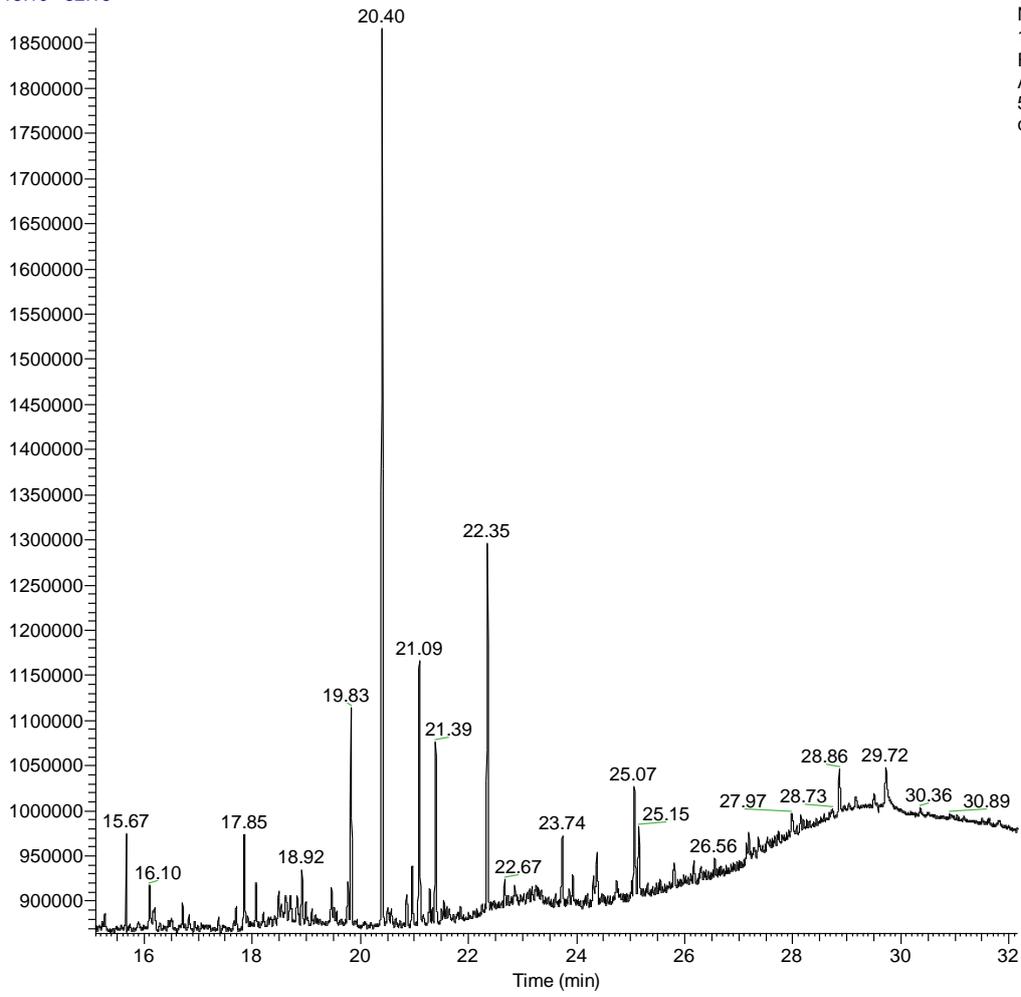
NL:
2.01E6
FID
Analog
2_EceM

RT: 16.50 - 31.96

NL:
1.72E6
FID
Analog
3_EcaCS



RT: 15.10 - 32.16



NL:
1.87E6
FID
Analog
5_extrato_a
cetonico

RT: 19.37 - 33.46

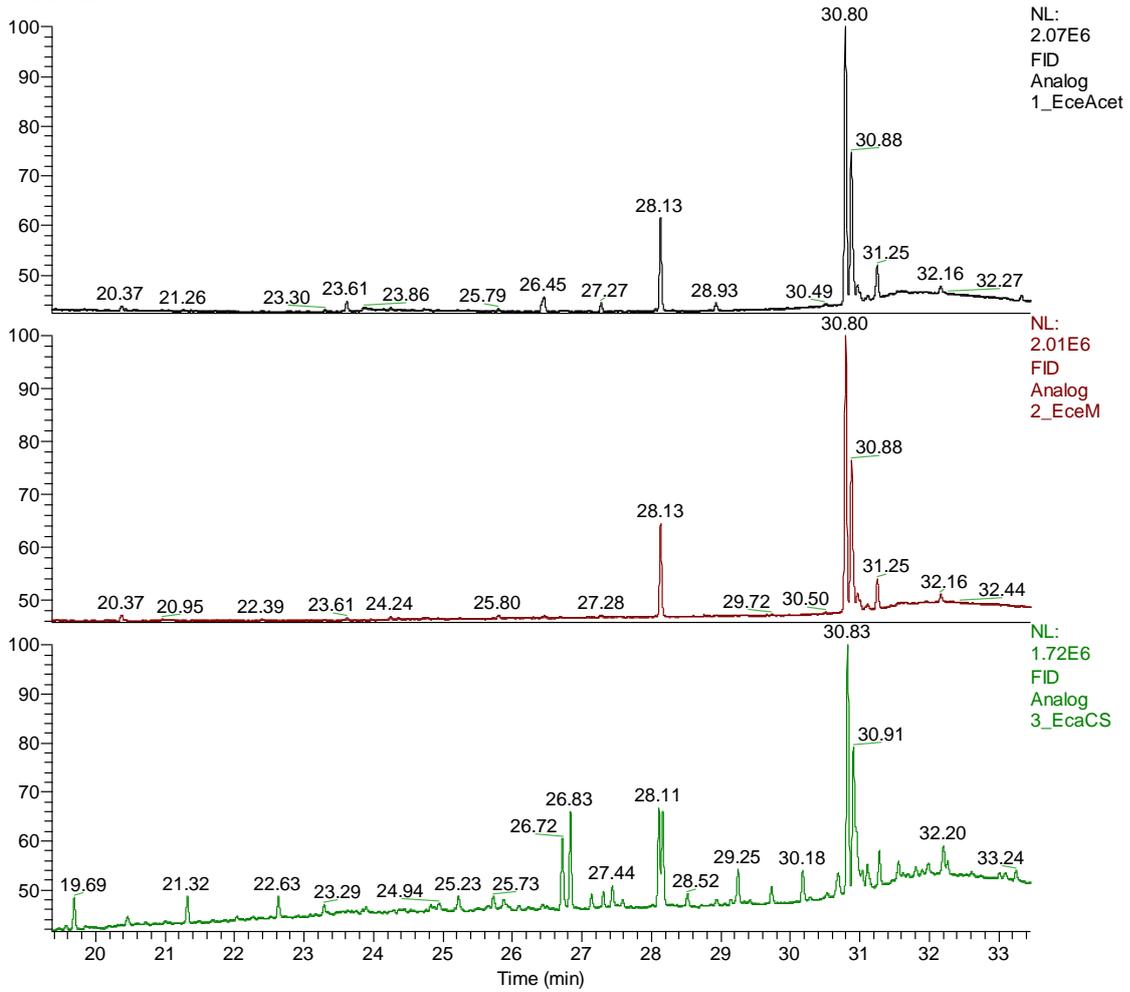


Figura 5 - Cascas coletadas de *M. guianensis*



Fonte: Fernanda Bay Hurtado, 2013

Nota: Visualização da amostra vegetal coletada para extração fitoquímica

Figura 6 - Obtenção dos extratos das cascas de *M. guianensis*



(a)

(b)

Fonte: Renato Abreu Lima (LPQPN, 2013)

Legenda: Por trituração (a) e pelo método de maceração (b)

Figura 7 - Cromatografia de coluna do extrato das cascas de *M. guianensis*



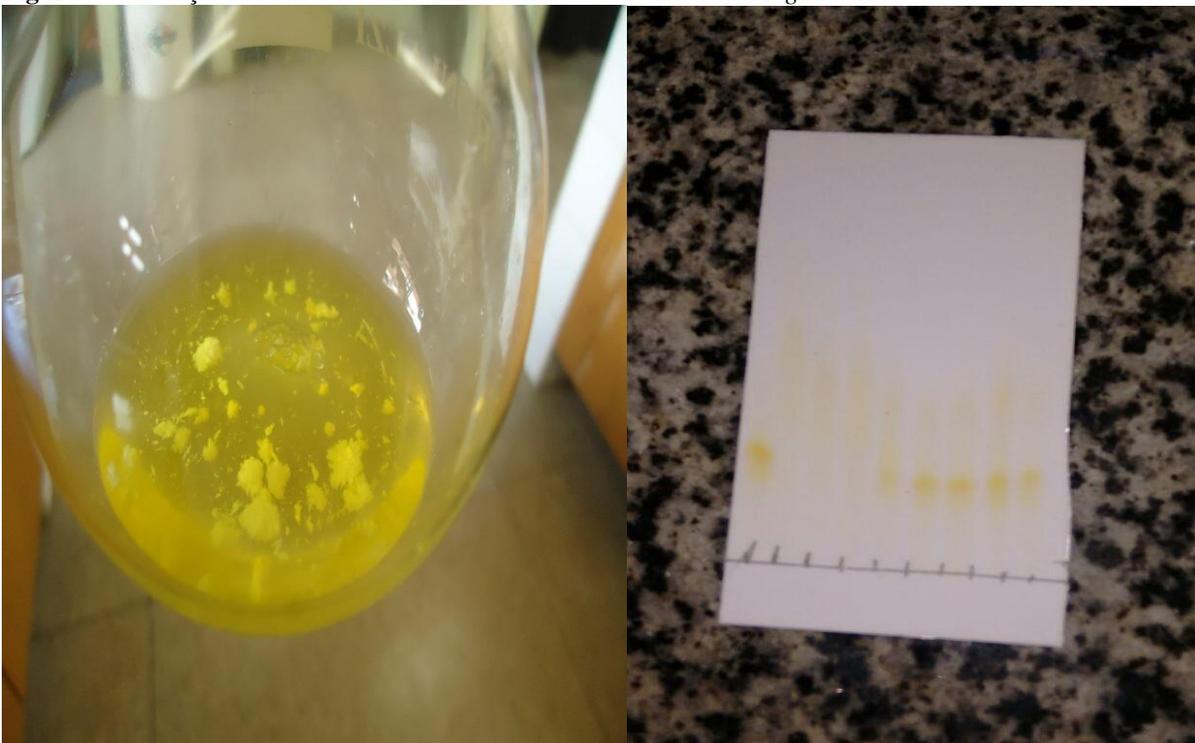
(a)

(b)

Fonte: Renato Abreu Lima (LPQPN, 2013)

Legenda: Sendo ilustrada a estrutura física (a); obtenção das frações destiladas (b)

Figura 8 - Obtenção das amostras da coluna do extrato das cascas de *M. guianensis*



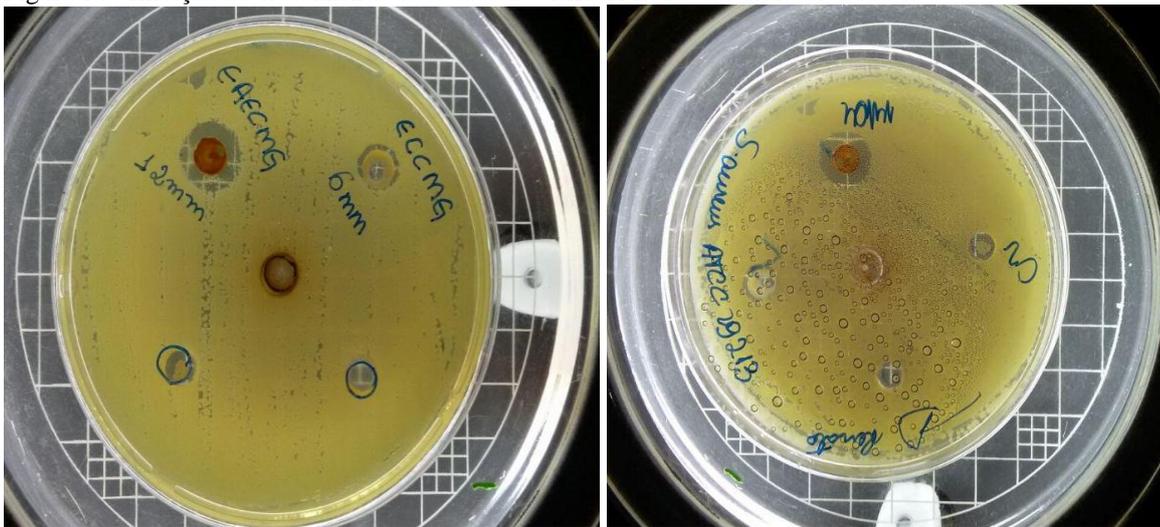
(a)

(b)

Fonte: Renato Abreu Lima (LPQPN, 2013)

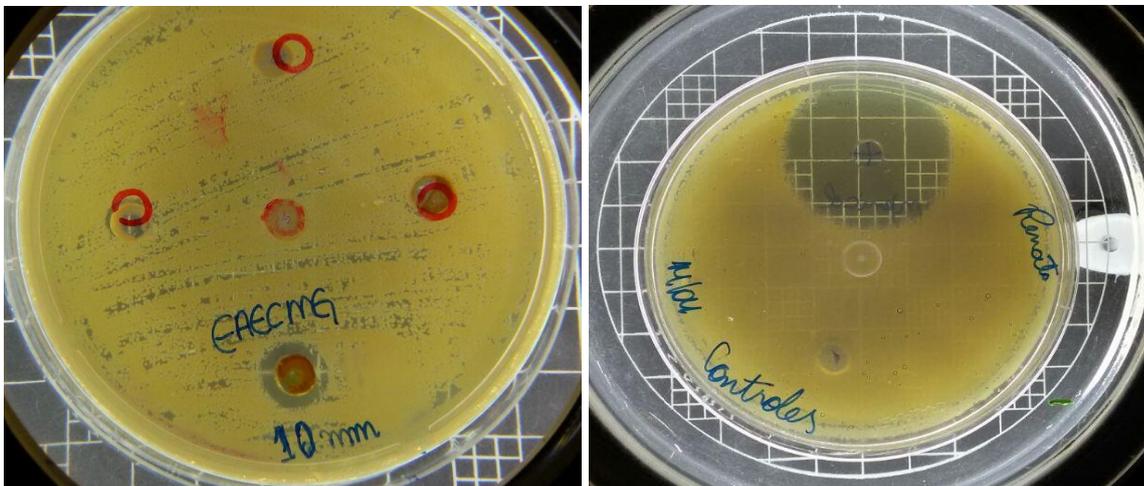
Legenda: Em balão de fundo chato após evaporação do eluente (a); perfil cromatográfico por CCD (b)

Figura 14 - Inibição de crescimento de *S. aureus* e MRSA frente aos extratos testados



(a)

(b)



(c)

(d)

Fonte: Renato Abreu Lima (CEPEM, 2015)

Nota: Inibição sobre *S. aureus* (a e b) e MRSA (c), utilizando diferentes extratos de *M. guianensis* e controles positivo e negativo (d)

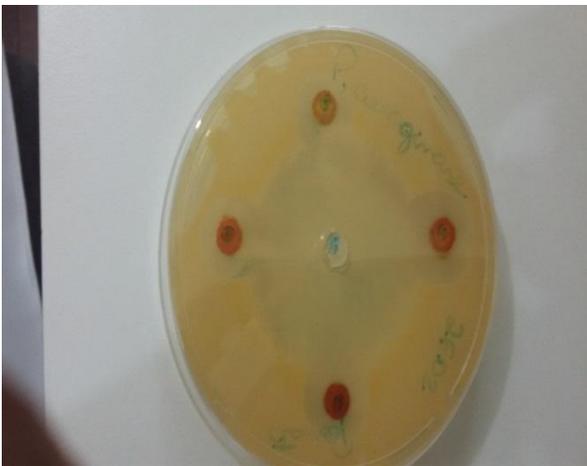
Figura 15 - Inibição sobre os micro-organismos frente às substâncias testadas



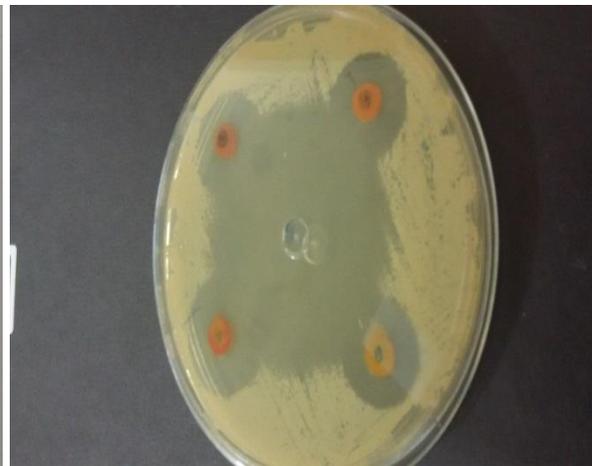
(a)



(b)



(c)



(d)

Fonte: Renato Abreu Lima (CEPEM, 2015)

Nota: inibição sobre *S. aureus* (a), MRSA (b), *P. aeruginosa* (c) e *K. pneumoniae* (d) com as quatro substâncias testadas de *M. guianensis*

ANEXOS

ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF EXTRACT ETHANOLIC FROM THE BARKS OF *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK ON *Candida albicans*

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK SOBRE *Candida albicans*

Renato Abreu Lima^{1,2*}, Fernanda Bay-Hurtado², Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti^{2,3}, Guilherme Matos Passarini², João Bezerra Facundo², Júlio Sancho Linhares Teixeira Militão², Valdir Alves Facundo²

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal de Rondônia, Rede BIONORTE, Porto Velho, RO, Brasil; ²Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais, Universidade Federal de Rondônia; ³Colégio de Aplicação, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC, Brasil

*E-mail: renatoabreu07@hotmail.com

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade fungicida do extrato etanólico das cascas de *Maytenus guianensis* sobre *Candida albicans in vitro*. As cascas coletadas foram devidamente secas e trituradas, sendo submetidas à extração em aparelho de Soxhlet com etanol p.a., sendo posteriormente diluídas com DMSO a 2% e para avaliar o potencial biológico sobre o fungo, utilizou-se à técnica de difusão em ágar em poços na concentração de 1mg.mL⁻¹, concentração esta já definida pela técnica de Menor Concentração Inibitória (MIC) realizada. Leveduras de *C. albicans* foram cultivadas em meio BDA durante 24 horas com a absorbância de turvação. Para o controle negativo, utilizou-se somente o meio BDA; controle positivo foi realizado com emulsificante Kasumin[®]. O delineamento foi inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. A avaliação consistiu em verificar os halos de inibição de crescimento fúngico, a cada 24 horas, durante cinco dias. Observou-se, que após 120 horas, o extrato etanólico das cascas de *M. guianensis* apresentou resultados dos halos de inibição sobre *C. albicans*, na qual os halos de inibição de crescimento foram de 1,52 mm do extrato etanólico, demonstrando maior espectro inibitório, se comparado com o controle negativo que foi de 2,87 mm, enquanto que no controle positivo o halo de inibição foi de 2,11 mm. Os resultados sinalizam o potencial antimicrobiano dessa planta, podendo ser promissoras para estudos de desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: Celastraceae. Triterpenos. Fitoquímica.

Abstract

The present work aimed the evaluation of antifungal activity of the ethanolic extract of the barks of *Maytenus guianensis* against *Candida albicans in vitro*. Collected barks were properly dried and grinded, being subjected to Soxhlet extraction with ethanol p.a, after dilution with DMSO (2%). For the evaluation of biological activity against the fungus, agar well diffusion technique was used in the concentration of 1mg.mL^{-1} , which was previously defined by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) technique performed. *Candida albicans* yeasts were cultured in BDA medium during 24 hours with turbidity absorbance. For negative control, only the BDA medium was used; Positive control was performed with the emulsifier chemical Kasumin[®]. The design was totally randomized, with three replicas per treatment. The evaluation consisted in assessing inhibition halos of fungal growth, each 24 hours, during five days. After 120 hours, the ethanolic extract from the barks of *M. guianensis* presented results of growth inhibition halos of 1,52 mm against *C. albicans*, demonstrating a larger inhibitory spectrum, if compared to negative control (inhibition halos of 2,11 mm). The results highlight the antimicrobial potential of *M. guianensis*, which may be promising for drug development research.

Keywords: Celastraceae. Triterpenes. Phytochemistry.

1. INTRODUCTION

Medicinal plants have been increasingly used by industrialized societies, not only by its curative power, but also by its economic availability (DUTRA, 2009). Brazil has the greatest plant diversity of the world, with an estimated number of over 20% of the total species of the planet. With more than fifty thousand species described, corresponding to 22% of the total, this rich biodiversity is accompanied by a wide acceptance of medicinal plant use and traditional knowledge associated to. Approximately 48% of the medicines utilized in therapeutics are originated directly or indirectly from natural products, especially medicinal plants (CARVALHO et al., 2007).

Thereby, medicinal plant users of various parts of the world maintain the practice of phytotherapies consumption, making valid the therapeutic informations that were accumulated during centuries (LUBIAN et al., 2010).

Celastraceae family comprises about 98 genera and 1.264 species and can be found all over the brazilian territory (FONSECA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2006). There are many studies demonstrating the active compounds of biological interest are associated to flavonoids, sesquiterpenes, alkaloids and pentacyclic triterpenes (GONÇALVES et al., 2005; MICHELIN et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006).

The genus *Maytenus*, is the biggest genus of the family Celastraceae, comprising about 80 species (OLIVEIRA et al., 2006) and among the biological activities attributed to these species we can cite antinociceptive, antifungal (CUNICO et al., 2006), antioxidant (MAGALHÃES et al., 2011),

anticytotoxic and antimutagenic (MENEGUETTI et al., 2014), antiplasmodial activity (BAY-HURTADO, 2013) and genotoxicity (MENEGUETTI et al., 2015).

Among the species with medicinal properties, *Maytenus guianensis* is a small tree endemic of Amazon, and popularly known as chichuá, xixuá and (SOUZA; LORENZI, 2008).

Its roots and stems are used as analgesic, anti-inflammatory, afrodisiac, muscular relaxant, antirreumatic and antidiarrheal, being also indicated in the treatment of arthritis, impotence, chills, bronchitis, haemorrhoidae, helminthiasis, lumbago, external ulcerations and gynecological uses and it is used as a cosmetic in cutaneous eruptions and prevents skin cancer (DUKE; VÁSQUEZ, 1994; REVILLA, 2002; BORRÁS, 2003).

The secondary metabolism of Celastraceae family presents as one of the most versatile of the known botanical families, wherein these metabolites accumulated by species of this family of plants that are characterized by its mixed biosynthetic origin (chiquimate/mevalonate), resulting in the production of amides or aromatic compounds essentially phenylpropanoidics of the lignane type and neolignanes; they are also characterized by the occurrence of terpenes, flavonoids and other classes of natural products (FAZOLIN et al., 2006).

Secondary metabolites, due to its roles on the interactions between organisms, will most often possess biological activities. Many of these compounds have a great significance in the pharmaceutical area, because they represent a promising source for the discovery of new molecules that are useful to humans (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

The genus *Candida* are normally found constituting the human normal microbiota, in which it is present in the mouth and digestive tract mucosae of healthy individuals, being capable of initiate an onset of infections, which are called candidiasis, principally in people presenting factors that predispose them to this infection, like hormonal factors and low immune resistance (KHAN et al., 2012; KIRAZ; YASEMIN, 2011).

Candida albicans is the most common pathogen in cutaneous and oropharyngeal candidiasis, however the non-albicans species has raised in numbers and in importance in the vaginal and systemic candidiasis (KHAN et al., 2012).

Due to the occurrence of unwanted effects, such as the resistance of some strains to the conventional drugs principally in immunosuppressed individuals and the presence of toxic effects related to these drugs, the study of plants with therapeutic properties, embracing those species with antifungal activity has been increasingly growing, so, such study is justified not only by the possibility of a determined plant species constitutes an alternative resource, but also due to the perspectives related to the isolation of substances that presents significant efficacy, with fewer indexes of disadvantages (ARAÚJO et al., 2004).

Considering this reality, due to the shortage of works related to this area, this work aimed to assess the presence of secondary metabolites of the barks of *Maytenus guianensis*, that could be used for pharmaceutical purposes. In order to assess the presence of metabolites, a phytochemical analysis of the ethanolic extract was done, with the purpose of evaluate its antifungal potential against *C. albicans* *in vitro*.

2. MATERIALS AND METHODS

The phytochemical study of the barks of *Maytenus guianensis* was performed at Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais (LPQPN) of Universidade Federal de Rondônia (UNIR), on Porto Velho-RO.

Barks (2,3 kg) of *M. guianensis* were collected at Reserva Florestal Adolpho Ducke, located at km 26 of Estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010) on Manaus, state of Amazonas. The botanical identification was made by the dispatch of an voucher specimen (record number 188.48) at Herbarium of Institute National of research in Amazon (INPA).

Barks properly dried and grinded (300g) were subjected to extraction in a Soxhlet extractor using hexane (MGFH), chloroform (MGFC), ethyl acetate (MGFAcEt), methanol (MGFE) and ethanol (MGFE). After the evaporation of the solvent, the extract yielded 12,84g of MGFH, 11,25g of MGFC, 18,75g of MGFAcEt, 20g of MGFM, and 28g of MGFE. We used the ethanol extract to present more material.

The isolation and purification of the chemical constituents of the barks of the ethanolic extract were performed by gas chromatography, using as bonded phase silica gel of Merck and Vetec (μm 63-200). The length and diameter of the column varied according to the amounts of the samples and of silica to be used. For the Thin Layer Chromatography (TLC) were used chromatoplates of silica gel 60 (μm 63-200). Above polyester T - 6145, Sigma Chemical CO (with fluorescence label of 250 nm).

The solvent used in the chromatographic elutions were: hexane, ethyl acetate and methanol, pure or combined in increasing degree of polarity. The disclosure of the chromatographed substances in CCD was made by exposition of the analytic chromatoplates to ultraviolet light (UV), reveled in the wavelength of 254 nm and by pulverization in an universal developed (mix of ethanol: acetic acid: sulphuric acid - 80:10:10), followed of warming in an incubator at 100°C, by approximately five minutes.

The mass spectra were obtained by electron impact (70 Ev) in a GC/MS Hewlett – Packard 5971 device using capillary column (30 m x 0,25 mm) dimethylpolysiloxane BD-1, having He as drag gas and the temperatures of 250°C in the injector, 200°C in the detector and in the column varying 1°/min between 35-180°C and 10°C/min in the range of 180-250°C.

The structure elucidation of the chemical constituents isolated from the bark of *M. guianensis* were Facundo et al. (2015).

After, the MGFE was used for the antifungal tests that were performed at the microbiology laboratory of Center of Teaching São Lucas, wherein the disk diffusion technique was used, in which disks of five mm of diameters of *C. albicans* culture (ATCC 10.231), were put in the center of Petri plaques containing Potato Dextrose Agar (PDA) medium, in the peripheral area of the plaques, four disks of filter paper were organized symmetrically, and were plunged in $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of plant extract during 1 minute, resulting in $0,12\text{mL}$ of extract to each disk. For the negative control, disks plunged in distilled water were used, and for the positive control, the chemical Kasumin[®] and ethanol (solvent control) were used on the concentration of $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, this concentration was based on the results of wells technique of the experiment is determined by the lowest inhibitory concentration (MIC) (LIMA et al., 2016).

After this process, the plaques were incubated at 25°C during five days. The evaluation consisted in measuring the diameter of the colonies (the mean of two steps that are diametrically opposed to each other) initiated after 24 hours of incubation, lasting five days, that is, until the time the fungal colonies of the witness treatment reached the whole surface of the plaque. The statistical design was entirely randomized, wherein there was three repetitions per treatment. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test, in which $p < 0,05$ was considered significant. The analysis was done from the software Graphad Prism 5.0.

The emulsificant chemical Kasumin[®], used in this work, was used for the comparison with our results, because it is a non-ionic surfactant, antifungal, antibacterial and systemic antibiotic, that has been used as a dispersant agent in the preparation of solutions, resulting in a more reliable procedure for the preparation of the inoculum. However, the surfactants might interact with organisms and drugs, affecting the *in vitro* activity of antimicrobial agents (NASCIMENTO et al., 2008).

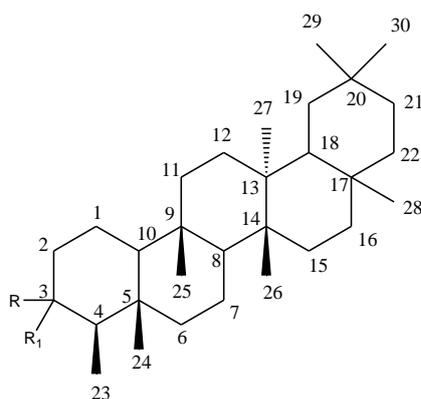
3. RESULTS AND DISCUSSION

The MGFE extract, which obtained the highest yield, was subjected to silica gel chromatography, and hexane, chlorophorm and acetone were used as solvents. After the evaporation of the solvents, the following yields of eluates were obtained: hexanic eluate (MGFEH, 9,1 g), chlorophormic eluate (MGFEC, 3,2 g) and acetone eluate (MGFEAC, 93,0 g). The MGFEAC eluate (45,0 g) was subjected to silica gel chromatography with hexane and chlorophorm in increasing polarity, thus yielding 45 subfractions.

Repeated chromatographic procedures led to the isolation of four substances which were called **MGFEAC-1**, **MGFEAC-2**, **MGFEAC-3** and **MGFEAC-4**. The substance named **MGFEAC-1** appeared as a white amorphous solid, soluble in chlorophorm, and when it was treated with acetic

anidride and concentrated sulphuric acid (Liebermann-Buchard test), it displayed a red coloration, so confirming the triterpenic nature of this compound. All of the spectroscopic data of RMN-1H and RMN-13C, uni and bidimensional, M.E. and I.R., revealed that MGFEAC-1 is a mixture of two triterpenes of the friedelane class, which were already isolated from other *Maytenus* species and named **MGFEAC-1a** friedeline and **MGFEAC-1b** friedelanol (Figure 1) (FACUNDO et al., 2015).

Figure 1 - Structure of the triterpenes friedeline (1a) and friedelanol (1b)



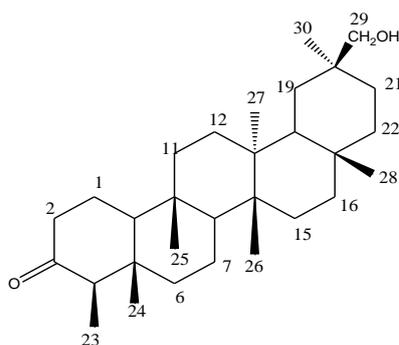
(1a) R=R₁=O

(1b) R=H; R₁=OH

Phytochemical studies performed in plants of the genus *Maytenus*, revealed these two triterpenes can be considered chemosystematic markers of the genus (NOSSACK et al., 2000).

The compound MGFEAC-2 appeared as amorphous white solid, soluble in chlorophorm, melting point of 268-269 °C, thin Layer Chromathography revealed only one spot and presented positive test for triterpenes when it was treated with Liebermann-Burchard reagent. The spectroscopic data of RMN-1H and RMN-13C, uni and bidimensional, M.E. and I.R., demonstrated the substance is a pentacyclic triterpene of the friedelane class. It is about the triterpene 29- hidroxyfriedelan-3-one (2) (Figure 2), already isolated in other plants of the genus *Maytenus* showing signs assigned to the carbonyl group of friedelanol class (BAY-HURTADO, 2014.)

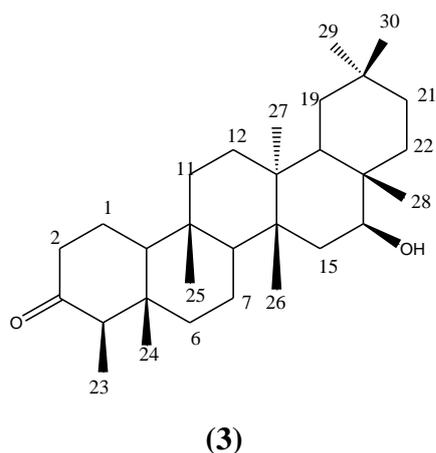
Figure 2 - Structure of the triterpene 29- hidroxyfriedelan-3-one



(2)

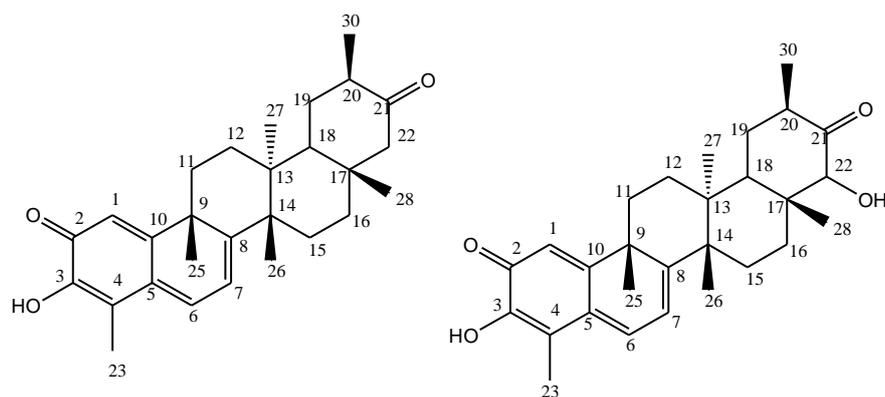
The compound named **MGFEAC-3** appeared as amorphous white solid, soluble in chlorophorm, melting point of 278-280 °C, presented only one spot when analyzed by thin layer chromatography and presented positive test for triterpenes when it was treated with Liebermann-Burchard reagent. The spectroscopic data of RMN-1H and RMN-13C, uni and bidimensional, M.E. and I.R., demonstrated the compound is the triterpene 16-hydroxyfriedelan-3-one (**3**) (Figure 3).

Figure 3 - Structure of the triterpene 16β-hydroxifriedelan-3-one



The compound **MGFEAC-4** appeared as yellow crystals, soluble in chlorophorm, unknown melting point, analysis in thin layer chromatography revealed only one stain and presented positive test for triterpenes when treated with Liebermann-Buchard reagent. Despite this compound has showed only one stain in TLC, the spectral data demonstrated it is a mixture of two quinonamethide triterpenes, named tingenine (**4a**) and tingenone (**4b**) (Figure 4) (FACUNDO et al., 2015), isolated from other plants of the genus *Maytenus*. Quinonamethide triterpenes are secondary metabolites whose occurrence is limited to species of the family Celastraceae (CORSINO et al., 2000).

Figure 4 - Structure of the following quinonamethide triterpenes tingenine (4a) e tingenone (4b)



(4a)

(4b)

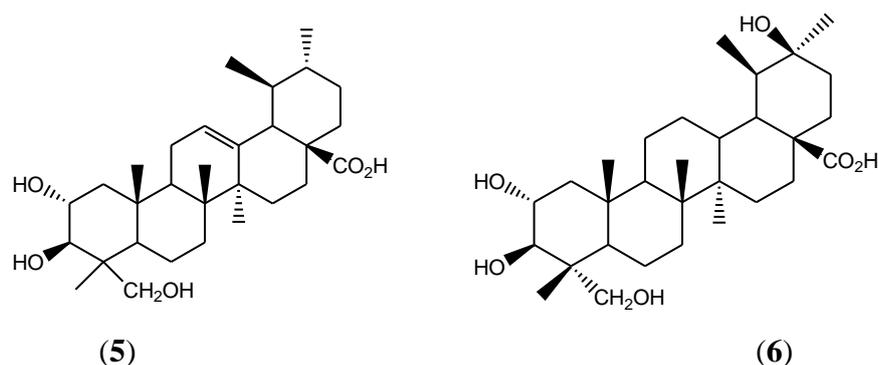
Phytochemical assays, coupled with gas chromatography linked to mass spectrometer of the extract MGFE, revealed the presence of other quinonamethide triterpenes, besides tingenine (4a) and tingenone (4b). In following steps to this research, new chromatographic procedures are being performed in order to lead to the isolation of other quinonamethide triterpenes of this extract. We also observed in these assays, the presence of substances belonging to the flavonoid class.

Pentacyclic triterpenes are of great importance due to various biological activities they presents, serving as candidates or prototypes of new drugs (ALVARENGA; FERRO, 2006). Studies with friedeline (1a), (Figure 4) indicated the antiproliferative activity, proapoptotic (MARTUCCIELLO et al., 2010), anti-inflammatory, analgesic and antipyretic (ANTONISAMY et al., 2011).

According to studies carried out in Germany, pentacyclic triterpenes are responsible by the activity observed in the treatment of actinic keratosis, a wound on the skin caused by the sun which is characterized by the presence of reddish or slightly brownish areas with a harsh surface, indicates the pentacyclic triterpenes are the substances responsible by the activity observed (HUYKE et al., 2006).

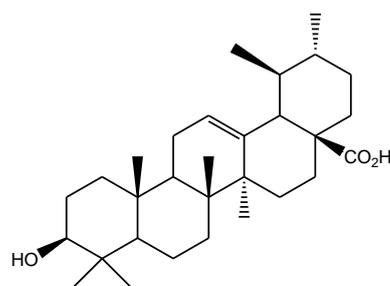
Asiatic (5) and madasiatic acid (6) (Figure 5) are components of a magistral preparation knowed as Madécassol[®], which can be used topically and internally, used as wound healer in burns and in the treatment of chronic venous insufficiency (JAMES et al., 2009).

Figure 5 - Structure of the madasiatic acid (5) and asiatic acid (6)



Another triterpene that has received attention is the ursolic acid (7) (Figure 6). A study performed at University of Iowa, United States, found the ursolic acid reduces muscle atrophy, fats, glycemia, cholesterol and triglycerides, besides promoting muscle growth.

Figure 6 - Structure of Ursolic Acid (7)



(7)

Quinonamethide triterpenes are compounds that, until now, had only been isolated from species of the family Celastraceae (CORSINO et al., 2000). Tingenone (4b) (Figure 4) is a quinonamethide triterpene, isolated from various plants of this family, including *Maytenus acanthophylla* (OLIVEIRA et al., 2006). Recent studies carried out by Silva and coworkers (2013), indicated the tingenone possesses great activity against *Microcystis novacekii*, a species of cyanobacterium that possesses a great capacity to form blooms and produce toxins, denominated microcystins, which are involved in environmental accidents, and are responsible by the majority of cases of animal and human intoxication.

The triterpenes found in this work may be originated from saponins, since the saponins possess both lipophilic (triterpenes or steroids) and hydrophilic components in its structure, a property that is related with the reduction of the surface tension of the water and its action as detergent and emulsificant. Triterpenes have shown great potential in some biological activities: are anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antiviral, analgesic, cardiovascular, antitumor (IKEDA, 2008).

An important factor to be taken into account when research involving medicinal plants is carried out, and which is usually also neglected, are the environmental conditions established at the time of the collection of the plant, like seasonality, weather, type of soil and air temperature. According to Freitas et al. (2004), the production of secondary metabolites by the plant organism works according to the interaction of the plant with its environment in response to chemical and biological factors. It may explain divergent results of extracts of the same species, when specimens of this species are collected in different locations and seasons.

In respect to the antifungal potential, we verified the ethanolic extract of the bark of *M. guianensis* presented inhibition on *C. albicans*, in which in the end of 120 hours, the growth mean of the fungi colonies in which the plant extract was used was 1.52 mm; in the negative control, using the sterile distilled water, the mean was 2.9 mm; using ethanol, the mean was 2.11 mm, whilst in the positive control, using the chemical, the mean inhibition was 2.78 mm (Table 1).

Table 1. Mean inhibition of the growth (mm) of the fungus *C. albicans* subjected to exposition to the plant extract of the bark of *M. guianensis in vitro* during 120 hours

Treatments	Hours					Means
	24	48	72	96	120	
Plant Extract	1,36	1,53	1,53	1,6	1,6	1,52±0,59
Positive control	2,66	2,83	2,83	3,03	3,03	2,87±0,29
Negative control	1,5	2,4	2,7	3,3	4,6	2,9±0,25

Statistically significant relative to distilled water * $p < 0,05$; statistically significant relative to the chemical # $p < 0,05$.

According to the statistic analysis above, one can be seen that the results using the plant extract were significant in comparison to distilled water, noting a satisfactory result, however it was not satisfactory as the result of that of the chemical, and because of it, a difference relative to the chemical can also be observed, but the results are encouraging since the extract tested was the crude extract, being indicated further studies with secondary metabolites, for a better evaluation against *C. albicans*. Another important point is that the extract used showed better results than that of the ethanol, since the ethanol did not have significance relative to distilled water.

Similar results were found by Annan et al. (2009) using friedeline, also isolated in the present work, from the methanolic extract of *Paullinia pinnata* L. roots against *S. aureus* and MRSA using the MIC on the concentration of 256µg/mL relative to positive control using tetracycline (MIC= 128µg/mL). However, other authors suggest that biological assays aiming toxicity at different concentrations must be carried out.

Plants of this family were widely investigated as a source of secondary metabolites and it was found they may be powerful relative to its insecticide and antifungal activities (SANTOS et al., 2014).

The antimicrobial activities were described for pentacyclic triterpenes, such as oleananes, ursanes e friedelane lupanes. It is speculated the mechanism of action of triterpenes is due to membrane lysis of cellular microorganisms. For this purpose, the hexanic extract and three oxofriedelane-triterpenes (1), 3-oxo-12a-hydroxyfriedelane (3), 3,16-dioxofriedelane (5) e 3-oxo-12a, 29-dihydroxyfriedelane (6) of *M. gonoclada* were tested against the pattern of two lineages of *Escherichia coli* bacterium, *Citrobacter freundii*, *Bacillus cereus* and against the yeast *Candida albicans*, using the disk-diffusion test (AWANCHIRI et al., 2009)

Many of the secondary metabolites present in the family Celastraceae, presents pronounced biological activities, in which are included antifungal activities (MARQUES et al., 2007).

The results similar were of Lima et al. (2016) together with the data described in the literature, clearly show that the *M. guianensis* species is a rich source of triterpenes from the classes of friedelan and quinone-methide, and has various biological activities, provides the first reports of results that demonstrate the effectiveness of substances, obtained from *M. guianensis*, on four ATCC bacteria, evaluated using the minimum inhibitory concentration test, ranging, in most, from 250 to 1.95 µg/mL concentrations.

CONCLUSION

The results of this study showed that *Maytenus guianensis* is a rich source of triterpenes of the friedelane and quinonamethide classes. According to data on literature cited along this manuscript, the triterpenes belonging to these classes has shown several biological activities. Furthermore, it was found the ethanolic extract inhibited the growth of *C. albicans*, relative to the chemical. However, other concentrations and methodologies using new isolated compounds from *M. guianensis* must be tested in order to improve the comprehension of the fungus-plant relationship.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to FAPEAM by the scholarship concession.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

ALVARENGA, E.; FERRO, E.A. Bioactive triterpenes and related compounds from Celastraceae. **Studies in Natural Studies in Natural Products Chemistry**, v.33, p.239-242, 2006.

ANNAN K.; ADU, F.; GBEDEMA, S.Y. Friedelin: a bacterial resistance modulator from *Paullinia pinnata* L. **Journal of Science and Technology**, v.29, n.1, p.152-159, 2009.

ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. in mouse and rat models. **Journal of Pharmacy and Pharmacological**, v.63, p.1070-1072, 2011.

AWANCHIRI, S.S.; TRINH-VAN-DUFAT, H.; SHIRRI, J.C.; DONGFACK, M.D.J.; NGUENANG, G.M.; BOUTEFNOUCHET, S.; FOMUM, Z.T.; SEGUIN, E.; VERITE, P.; TILLEQUIN, F.; WANDJI, J. **Phytochemistry**, v.70, p.419, 2009.

ARAÚJO, J.C.L.V; LIMA, E.O; CABALLOS, B.S.O; FREIRE, K.R.L; SOUZA E.L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microorganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v.33, p.55-64, 2004.

BAY-HURTADO, F. **Contribuição ao estudo fitoquímico e biológico da entrecasca da espécie *Maytenus guianensis* Klotzsh ex Reissek**. 2013. 170 f. Doutorado em Biologia Experimental Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho.

BORRÁS, M.R.L. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas - Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa**. Manaus: Valer, 322pp. 2003.

CARVALHO, C.A. **Avaliação do potencial antifúngico, antioxidante e citotóxico dos extratos de *Jacaranda decurrens* cham. (carobinha)**. 2007. 94 f. Dissertação em Química Orgânica, Universidade de Ribeirão Preto: USP.

CORSINO, J.; CARVALHO, P.R.F.; KATO, M.J.; LATORRE, L.R.; OLIVEIRA, O.M.M.F.; ARAÚJO, A.R.; BOLZANI, V.S.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v.55, p.741-748, 2000.

CUNICO, M.M.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; CARVALHO, J.L.S.; PEITZ, C.; AUER, C.G.; GRICOLETTI-JÚNIOR, A. Estudo da atividade antifúngica do *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae: um teste *in vivo*. **Visão acadêmica**, v.4, n.2, p.77-82, 2006.

DUKE, J.A.; VÁSQUEZ, R. **Amazonian ethnobotanical dictionary**. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1994. 114p.

DUTRA, M.G. **Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás**. Dissertação (Mestrado Multidisciplinar em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente). Anápolis: Centro Universitário de Anápolis-UniEvangélica, p.112, 2009.

FACUNDO, V.A.; MENEGUETTI, D.U.O.; MILITÃO, J.S.L.T.; LIMA, R.A.; HURTADO, F.B.; CASSEB, A.A.; TEIXEIRA, L.F.; SILVA, I.C.; SILVA, G.V.J.; JÚNIOR-LACERDA, V. Chemical constituents from *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Amazon rainforest. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.58, p.270-275, 2015.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; CATANI, V.; COSTA, C.R. **Potencialidades da pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.):** características gerais e resultados de pesquisa. Rio Branco: Embrapa Acre. p. 53, 2006.

FONSECA, P.N.D.; SILVA, G.D.F.; CARVALHO, J.J.; SALAZAR, G.C.M.; DUARTE, L.P. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. **Química Nova**, v.30, n.4, p.842-847, 2007.

FREITAS, M.S.M.; SOUZA, P.H.; BELLO, O.I.; JAQUES, R.S. Crescimento e produção de fenois totais em carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) D.C.] em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, na presença e na ausência de adubação mineral. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.3, p.30-34, 2004.

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.

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

HUYKE, C.; LASZCZYK, M.; SCHEFFLER, A.; ERNST, R.; SCHEMPP, C.M. Treatment of actinic keratoses with birch bark extract: a pilot study. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v.4, p.130-132, 2006.

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.52, p.26-42, 2008.

JAMES, J.T.; DUBERY, I.A. Pentacyclic Triterpenoids from the Medicinal Herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. **Molecule**, v.14, 3920-3922, 2009.

KHAN, R.; ISLAM, B.; AKRAM, M.; SHAKIL, S.; AHMAD, A.A.; ALI, S.M.; SIDDIQUI, M.; KHAN, A.U. Antimicrobial Activity Of Fiver Herbal Extracts Against Muiti Drug Resistant (MRD) Strains Of Bacteria And Fungus Of Clinical Origin. **Molecules**, v.14, n.2, p.586-597, 2009.

KIRAZ, N. U. ; YASEMIN, O. Z. A distribuição das espécies e suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *Candida* de um hospital universitário na Turquia ao longo de um período de 5 anos. **Medical Mycology**, v.49, n.2, p.126-131, 2011.

LIMA, R.A.; HURTADO-BAY, F.; MENEGUETTI, D.U.O.; FACUNDO, J.B.; MILITÃO, J.S.L.T.; MATOS, N.B.; FACUNDO, V.A. Microbiological evaluation of isolated compounds from the bark of *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae). **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.19, n.1, p.381-388, 2016.

LUBIAN, C.T.; TEIXEIRA, J.M.; LUND, R.G.; NASCENTE, P.S.; DEL PINO, F.A.B. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.2, p.157-162, 2010.

MAGALHÃES, C.G.; FERRARI, F.C.; GUIMARÃES, D.A.S.; SILVA, G.D.F.; DUARTE, L.P.; FIGUEIREDO, R.C.; FILHO, S.A.V. *Maytenus salicifolia*: triterpenes isolated from stems and antioxidant property of extracts from aerial parts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.6, p.415-19, 2011.

MARQUES, J.V. KITAMURA, R.O.S. LAGO, J.H.G. YOUNG, M.C.M. Antifungal amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmanseggianum*. **Journal of Natural Products**, v.70, p.2036-2039, 2007.

MARTUCCIELLO, S.; BALESTRIERI, M.L.; FELICE, F.; ESTEVAM, C.S.; SANT'ANA, A.E.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Effects of triterpene derivatives from *Maytenus rigida* on VEGF-induced Kaposi's sarcoma cell proliferation. **Chemico-biological Interactions**, v.183, p.450-454, 2010.

MENEGUETTI, D.U.O.; LIMA, R.A.; SILVA, J.B.; SILVA, R.P.; PAGOTTO, R.C.; FACUNDO, V.A. Análise citotóxica e mutagênica do extrato aquoso de *Maytenus Guyanensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae) chichuá (xixuá) amazônico. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 3, p.301-309, 2014.

MENEGUETTI, D.U.O.; LIMA, R.A.; SILVA, F.C.; PASSARINI, G.M.; FACUNDO, J.B.; PAGOTTO, R.C.; MILITÃO, J.S.L.T.; FACUNDO, V.A. Acute genotoxicity analysis *in vivo* of the aqueous extract of *Maytenus guyanensis* Amazonian chichuá. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.25, n.2, p.164-169, 2015.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.316-320, 2005.

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.2, p.108-113, 2008.

OLIVEIRA, D.M.; SILVA, G.D.F.; DUARTE, L.P.; VIEIRA, S.A. Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acantophylla* Reissek, Celastraceae. **Biochemical Systemy Ecology**, v.34, p.661-665, 2006.

REVILLA, J. **Apontamentos para a cosmética Amazônica**. SEBRAE-INPA, Manaus, Amazonas, 2002. 445p.

SANTOS, M.R.A.; LIMA, R.A.; FERNANDES, C.F.; BRAGA, A.G.S; FACUNDO, V.A. Antifungal activity of *Hedychium coronarium* J. König essential oil against *Fusarium oxysporum* Schlecht and *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk *in vitro*. **Ciência e Natura**, v.36, n.2, p.683-687, 2014.

SILVA, F.C.; GUEDES, F.A.F.; FRANCO, M.W.; BARBOSA, F.A.R.; MARRA, C.A.; DUARTE, L.P.; SILVA, G.D.F.; VIEIRA-FILHO, S.A. Algistatic effect of a quinonamethide triterpene on *Microcystis novacekii*. **Journal of Applied Phycology**, v.25, p.1720-1723, 2013.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado no APG II. São Paulo: Instituto Plantarum. 703p. 2008.

**Microbiological evaluation of isolated compounds from the bark of *Maytenus guianensis*
Klotzsch ex Reissek (Celastraceae)**

Avaliação microbiológica dos isolados das cascas de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek
(Celastraceae)

Renato Abreu Lima^{1,2*}; Fernanda Bay-Hurtado²; Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti³; João Bezerra Facundo²; Júlio Sancho Linhares Teixeira Militão²; Najla Benevides Matos⁴; Valdir Alves Facundo²

¹Postgraduate Program of Biodiversity and Biotechnology of the Legal Amazon (Bionorte Network), Manaus, Amazonas State, Brazil; ²Department of Chemistry of the Federal University of Rondônia (UNIR), Porto Velho, Rondônia State, Brazil; ³College of Application (CAP) of the Federal University of Acre (UFAC), Rio Branco, Acre, Brazil; ⁴Research Center for Tropical Medicine, (CEPEM), Porto Velho, Rondônia, Brazil. * E-mail: renatoabreu07@hotmail.com

Abstract

Maytenus guianensis Klotzsch ex Reissek is a Brazilian Amazon plant widely used in traditional medicine to treat malaria, leishmaniasis and cancer. Due to the increasing number of resistant strains of microorganisms to known antimicrobial substances, various extracts of medicinal plants are being assayed with the purpose of developing new compounds with antimicrobial activities. Thus, the present work aimed to evaluate the biological potential of isolated substances of the bark of *M. guianensis* on bacteria. The barks were collected at the Reserva Florestal Adolpho Ducke, in Manaus-AM. After, they were dried and grinded, being subjected to Soxhlet extraction with different solvents according to their polarity degree. The isolated substances were diluted with DMSO 2 %, and for the evaluation of the antibacterial potential, the agar well diffusion technique was used. The design was totally randomized with two replicas per treatment. The evaluation consisted on measuring bacteria colonial growth after 24 hours of the beginning of the experiment. The results obtained from the isolated substances of *M. guianensis* presented inhibitory effect against at least four out of the five bacteria tested, where satisfactory inhibition halos were noted. The results highlight the antimicrobial potential of this plant, which may be promising for the development of new drugs.

Keywords: Celastraceae. *Maytenus guianensis*. Bacteria. Biological assays.

Resumo

Maytenus guianensis Klotzsch ex Reissek é uma planta da Amazônia brasileira muito utilizada na medicina popular contra malária, leishmaniose e câncer. Com o aumento dos

microrganismos resistentes às substâncias antimicrobianas já conhecidas, vários extratos de plantas medicinais estão sendo testados com a finalidade de procurar novos compostos com atividade antimicrobiana reconhecida. Assim, este trabalho visa avaliar o potencial biológico das substâncias isoladas das cascas de *M. guianensis* sobre bactérias. As cascas foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke em Manaus-AM. Posteriormente, foram devidamente secas e trituradas, sendo submetidas à extração em aparelho de Soxhlet com diferentes solventes de acordo com grau de polaridade. As substâncias isoladas foram diluídas com DMSO a 2 % e para avaliar o potencial biológico sobre as bactérias, utilizou-se à técnica de difusão em ágar em poços. O delineamento foi o inteiramente casualizado com duas repetições por tratamento. A avaliação teste consistiu em medir o crescimento das colônias das bactérias, após 24 horas do início do experimento. Os resultados obtidos das substâncias isoladas de *M. guianensis* apresentaram efeito inibitório contra pelo menos quatro das cinco bactérias testadas notando-se halos de inibição satisfatórios. Os resultados sinalizam o potencial antimicrobiano dessa planta, podendo ser promissoras para estudos de desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: Celastraceae. *Mayenus guianensis*. Bactérias. Ensaio Biológicos.

1. Introduction

Brazil has the greatest plant diversity of the world, with an estimated number of over 20 % of the total species of the planet. With more than fifty thousand species described, corresponding to 22 % of the total, this rich biodiversity is accompanied by a wide acceptance of medicinal plant use and traditional knowledge associated to. Approximately 48 % of the medicines utilized in therapeutics are originated directly or indirectly from natural products, especially medicinal plants (CARVALHO et al., 2007).

In Amazon, there are several plant species bearing medicinal properties (OSAKADA, 2009), including the species belonging to the Celastraceae family, composed by 98 genera and roughly 1264 species (FONSECA ET AL., 2007; LORENZI & MATOS, 2008; OLIVEIRA et al., 2012), distributed all over the world, particularly in the tropical and subtropical regions, including the north of Africa, South America and Asia (SPIVEY et al., 2002; DUARTE et al., 2010; HURTADO, 2013; MOHAMED & PERWEZ, 2014).

Furthermore, the family has species with great therapeutical relevance, presenting various pharmacological activities, such as: antiulcerogenic, insecticidal, immunosuppressive, anti-rheumatic, antibacterial and anticancer (FONSECA et al., 2007), and given that, species of this family have been object of many phytochemical investigations and secondary metabolites isolated of these species have shown great biological activity (FONSECA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2010; DING et al., 2010; LIMA et al., 2010; ANTONISAMY et al., 2011; KENNEDY et al., 2011; SANTOS et al., 2013), of

which we can cite the friedelane pentacyclic triterpenes, quinonamethides, sesquiterpenes, secofriedelanes, steroids, agarofuranic derivatives, proanthocyanidin glycosides, flavonoids, sesquiterpene pyridine alkaloids and catequines (SILVA et al., 2008; SOUSA et al., 2012; HURTADO, 2013).

Maytenus guianensis is a small tree, endemic of terra-firme regions in Amazon, and is popularly known as chichuá, xixuá, chuchahuasi, chucchu huashu, chuchuasi, chuchasha and tonipulmon (DUKE & VÁSQUEZ, 1994; REVILLA, 2002).

Its roots and stems are used as analgesic, anti-inflammatory, aphrodisiac, muscular relaxant, antirheumatic and anti-diarreaic. The species is also indicated for the treatment of arthritis, impotence, cold, bronchitis, haemorrhoid, helminthiasis, lumbago, external ulcerae and gynecological uses (BORRÁS, 2003). As a cosmetic, it is used in cutaneous eruptions and prevents skin cancer (REVILLA, 2002), besides of its antiparasitic action (MACARI et al., 2006), demonstrating a great ethnopharmacological potential to be explored.

Bacteria easily develop resistance to some antibacterial agents. However, since the discovery of first antimicrobials, a wide variety of agents have been studied for its activities on bacterial growth or survival (HURTADO, 2013).

Considering the diversity of substances on plants and the possibility to find new antibacterial substances, this work aimed to evaluate the activity of substances isolated from the barks of *M. guianensis* against *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Escherichia coli* (ATCC 25922).

2. Methods

The phytochemical study of the barks of *M. guianensis* was carried out at the Research Laboratory of Chemistry of Natural Products of the Federal University of Rondônia (UNIR), on Porto Velho-RO. The collection of the fresh barks of *M. guianensis* was performed at Reserva Florestal Adolpho Ducke, located km 26 of Estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010) on Manaus, AM, with the geographical coordinates 0°10' S, 67°05' W, on the summer period of 2010. The botanical identification was performed by the dispatch of an exsiccate at the Herbarium of the National Institute for Amazon Research (INPA), where it was registered by the number 188.485 and identified by the researcher Doctor José Eduardo da Silva Ribeiro.

The barks were dried in an electric heater with air circulation at a temperature of 50° C during 48 hours. After, the dried barks were grinded for the increase of surface area, and subjected to three extractions by percolation with ethanol P.A. 95 % at room temperature during three days, each percolation. After the evaporation of ethanol, the ethanolic extract, named MGCE, was obtained. Part

of the ethanolic extract was destined for the isolation and purification of active principles, while the other part of the extract was directed to antibacterial activity assay.

The isolation and purification of the chemical constituents of the ethanolic extract of the barks were performed by glass column chromatography, using as standing phase silica gel of Merck and Vetec (μm 63-200). The length and diameter of the columns changed according to the amounts of silica and samples used. For Thin Layer Chromatography (TLC), plates of silica gel 60 (μm 2-25) above polyester T – 6145, Sigma Chemical CO (with fluorescence label of 250 nm, from Carlo Erba trademark).

The solvents used in the chromatographic elution were: n-hexane, ethyl acetate and methanol, pure or combined in an increasing gradient of polarity, from which fractions of 250 mL each were collected. After concentration in rotaevaporator Labor and repeated chromatographic procedures in silica gel columns, lead to the obtaining of some isolated substances. The revelation of the substances chromatographed by TLC were carried out by exposition of the analytical plaques in ultraviolet light (UV), revealed in a wavelength of 254 nm and pulverized with an universal revelator (mixture of ethanol: acetic acid: sulphuric acid – 80:10:10), followed by warming in a heater, between 50-100° C, during approximately five minutes.

The mass specters were obtained by electronic impact (70 Ev) on a CG/MS Hewlett - Packard 5971 instrument using a dimethylpolysiloxane BD-1 capillary column (30 m x 0,25 mm), using He as carrier gas and temperatures of 250° C in the injector, 200° C in the detector and in the column varying 1°/min between 35-180° C and 10° C/min in the interval of 180-250° C.

The study of biological activity of the ethanolic extract and isolated substances of the barks of *M. guianensis* against *S. aureus* (ATCC 29213), methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), *K. pneumoniae* (ATCC 13883), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) and *E. coli* (ATCC 25922) were carried out at Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM), on Porto Velho-RO, where the Standard Operational Procedure (SOP) was used to execute the agar diffusion test.

In the agar diffusion technique, it was observed the resistance profile and sensibility of bacteria against isolated substances of *M. guianensis* by growth inhibition halos *in vitro* as recommended by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), with modifications suggested by Cursino et al. (2013) and Pieri et al. (2010).

10 mL of LB agar were spilled on 90 X 15 Petri dishes, which was named inferior layer. After solidification of this layer, 15 mL of Müller-Hinton agar were put into the inferior layer, being named superior layer. After culture solidification, cylindrical holes were made by using sterile tips of 200 μL , where there must be equidistance between the holes to avoid convergent inhibition zones.

On the surface of Müller-Hinton agar culture medium, the seeding was done by an impregnated swab with the inoculus previously adjusted at 0,5 on McFarland scale of the bacteria *S. aureus* (ATCC 29213), methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), *K. pneumoniae* (ATCC 13883), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) and *E. coli* (ATCC 25922).

At the holes were added 40 µL of positive control at the concentration of 0,6 mg/mL and the isolated substances with the concentrations of 40, 20, 10 and 5 µg/mL. After the administration of the isolated substances, the plaques (dishes) were incubated at 37° C temperature during 24 hours. With the diffusion of the product in agar, sensitive bacteria to the substances presented an inhibition halo around the hole.

The reading of halos was measured in millimeters using a millimetric ruler. The diameters of total inhibition halos (judged by naked eye) were measured, including the hole diameter. The inhibition halo was considered to be the area without visually detectable growth.

The criterion for assessing inhibitory products was the presence of inhibition halos around the holes. The sensibility profile of target-bacteria to tested products was classified according to the following scale: resistant (absence of inhibition halo), little sensitive (up to 10 mm diameter halos); moderately sensitive (between 20 and 30 mm halos) and severely sensitive (over 30 mm halos).

The inhibition zones obtained for the positive control were used for comparison of bacterial sensitivity profile. The tests were performed in duplicates, and the positive results were confirmed with one more repetition, in duplicates, and the final result was determined by the arithmetic mean of the diameters of inhibition halos by the software GraphPad Prism 5.0.

3. Results and discussion

Repeated chromatographic procedures of MGCE lead to the isolation of four substances named MGFEAC-1, MGFEAC-2, MGFEAC-3 and MGFEAC-4, which after analyses of spectroscopic data of ¹H and uni and bidimensional ¹³C, IV and EM RMN, lead to the conclusion that MGFEAC-1 and MGFEAC-4 were actually mixtures of triterpenes, where MGFEAC-1 corresponds to the triterpenes friedeline and friedelol, and MGFEAC-4 corresponded to tingenine B and tingenone. MGFEAC-2 and MGFEAC-3 were identified as the triterpenes 29-hydroxyfriedelan-3-one and 16-hydroxyfriedelan-3-one, respectively. These compounds were isolated from the bark of this plant (FACUNDO et al., 2015).

Phytochemical studies carried out in plants of the genus *Maytenus* revealed the triterpenes friedeline and friedelol can be considered chemosystematic markers of the genus (NOSSACK et al., 2000).

Triterpenes present significant interest due to its various biological activities, serving as candidates or prototypes of new medicines (ALVARENGA & FERRO, 2006). Studies with friedeline

showed antiproliferative, proapoptotic (MARTUCCIELLO et al., 2010), anti-inflammatory, analgesic and antipyretic, (ANTONISAMY et al., 2011) and allelopathic activities (SANTOS et al., 2008).

According to studies carried out by Huyke et al. (2006), the pentacyclic triterpenes are responsible for the activity in the treatment of actinic keratosis, a skin wound caused by sun that is characterized by reddish or slightly brownish areas with rough surfaces, indicating the pentacyclic triterpenes are the main cause of the activity.

Quinonamethide triterpenes are compounds of isolation restricted to plants belonging to the Celastraceae family (CURSINO et al., 2000). Tingenone is a quinonamethide triterpene isolated from various plants of this family, among them *M. acanthophylla* (OLIVEIRA et al., 2006). Recent works carried out by Silva et al. (2013), indicate tingenone has potent activity against *Microcystis novacekii*, a cyanobacteria able of forming florations and producing toxins, named microcystins, which are involved in environmental accidents, and are largely responsible for cases of both human and animal intoxication.

The evaluation of substances contamination previously performed to the antimicrobial test indicated these substances were free of contamination by bacteria and fungi, without development of other colonies on both LB and agar media after incubation. These results revealed the substances presented good microbiological conditions in the present work.

According to the results obtained by SOP, the four isolated substances MGFEAC-1, MGFEAC-2, MGFEAC-3 and MGFEAC-4 presented biological activity for *S. aureus* (Table 1), MRSA (Table 2), *P. aeruginosa* (Table 3) and *K. pneumoniae* (Table 4), with growth inhibition halos on the tested concentrations being observed.

In table 1 it is noted the concentration of 20µg/mL obtained the best results when compared to the positive control (cloranfenicol), exhibiting inhibition halos ranging from 12 to 18 mm for the tested bacteria.

The triterpene 29-hidroxyfriedelan-3-one (MGFEAC-3), was also isolated from the roots of *Salacia kraussi* Miers and is cited in literature because of its potent cytotoxicity against HT-29 cell line (human colon adenocarcinoma) and because of its antimalarial activity (FIGUEIREDO et al., 1998).

Table 1: Biological activity of isolated compounds of *M. guianensis* in different concentrations against *S. aureus* in mm*

Samples	Concentration (µg/mL)			
	40	20	10	5
MGFEAC-1	18	12	16	18
MGFEAC-2	12	12	13	14
MGFEAC-3	24	14	24	24

MGFEAC-4	18	18	18	18
P. CONTROL	30	30	30	30

* Results accompanied by mean and standard deviation

Furthermore, this compound presented antimicrobial activities against *S. aureus*, *Bacillus cereus* and *Candida albicans* in the concentration of 5 µg/mL, inhibiting between 8-10 mm relative to positive control (cloranfenicol) (OLIVEIRA, 2014).

In table 2 it can be noted the concentrations of 10 and 40 µg/mL had the best results relative to positive control (cloranfenicol), showing inhibition halos from 9 to 12 mm for the tested bacteria. The triterpene 29-hydroxyfriedelan-3-one (MGFEAC-3) presented the best activity profile in comparison to the other tested substances regardless of concentrations used.

Table 2: Biological activity of isolated compounds of *M. guianensis* in different concentrations against *P. MRSA* in mm*

Samples	Concentration (µg/mL)			
	40	20	10	5
MGFEAC-1	11	12	10	13
MGFEAC-2	9	10	10	16
MGFEAC-3	12	12	12	12
MGFEAC-4	12	12	12	12
P. CONTROL	30	30	30	30

* Results accompanied by mean and standard deviation

In table 3, it can be noted the concentration of 10 µg/mL had the best results when compared to positive control (cloranfenicol), showing inhibition halos from 12 to 13 mm for tested bacteria and according with the specific SOP the sensitivity profile was moderately sensitive.

Table 3: Biological activity of isolated compounds of *M. guianensis* in different concentrations against *P. aeruginosa* in mm*

Samples	Concentration (µg/mL)			
	40	20	10	5
MGFEAC-1	12	12	12	14
MGFEAC-2	12	12	12	12
MGFEAC-3	18	18	12	18

MGFEAC-4	12	12	13	16
P. CONTROL	30	30	30	30

* Results accompanied by mean and standard deviation

The triterpene 29-hydroxyfriedelan-3-one was isolated one more time from the barks of *M. guianensis*, and the fact that it presented a better profile relative to the rest of the substances tested, as well as for *S. aureus* and MRSA, is highlighted again. In table 4 it can be noted the concentrations of 10 and 20 µg/mL had the best results when compared to positive control (cloranfenicol) showing inhibition halos of roughly 12 mm for the tested bacteria and according to the specific SOP was little sensitive.

Table 4: Biological activity of isolated compounds of *M. guianensis* in different concentrations against *K. pneumoniae* in mm *

Samples	Concentration (µg/mL)			
	40	20	10	5
MGFEAC-1	14	12	12	17
MGFEAC-2	12	12	12	13
MGFEAC-3	12	12	12	12
MGFEAC-4	9	12	12	12
P. CONTROL	30	30	30	30

*Results accompanied by mean and standard deviation

The triterpene tingenone, one of the components presents in MGFEAC-4, has antibacterial activity against *S. petenensis* (SETZER et al., 2001) and the mixture MGFEAC-4 has antioxidant activity (HURTADO, 2013). The triterpenes tingenone and tingenine B, separated from each other, presented inhibitory effect on the enzyme aldose reductase, suggesting an antidiabetic potential (Morikawa et al., 2003).

A possible positive response of the tested substances over the bacteria was the utilization of DMSO on the concentration of 1-2 %, being an ideal concentration for its use in experiments, demonstrating the performance in the dissolution of the samples evaluated in this biological assay, as well as facilitated the dispersion of it in the culture medium, thus improving the quality of procedures with isolated substances.

According some authors the DMSO was inert for the development of *E. coli*, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp and *Klebsiella* sp (DALMARCO et al., 2007), for aminoglycoside-resistant *E. coli* (COUTINHO et al., 2009) and for *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* and *Ureaplasma urealyticum*

(CORDOVA et al., 2010). Sufredini et al., (2006), using DMSO at 50 % did not find toxicity for Gram-positive bacteria (*S. aureus* e *E. faecalis*) and Gram-negative bacteria (*E. coli* e *P. aeruginosa*).

Porfirio et al. (2009) and Ribeiro & Moura (2009) verified antibacterial activity in the extract of *Eleutherine plicata* Herb (marupazinho), showing higher activity against the gram positive bacterium *S. aureus*. The presence of quinonamethide triterpenes and tannins in the extract may be the main cause by the antimicrobial activity of the plant (DJIPA et al., 2000).

Correia et al. (2008) in his study with the crude extract of *Geissospermum argenteum* reported antimicrobial activity against *P. aeruginosa* strains on the concentrations of 20 µg/mL and 80 µg/mL for sensitive *S. aureus* and 5 µg/mL for multi-resistant *S. aureus*.

According on the antimicrobial activity by agar diffusion technique in wells of isolated compounds of *M. guianensis*, the results here presented against *S. aureus*, MRSA, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* present one more important evidence for the conclusion that plants are natural sources of antimicrobial substances that are not only active against pathogens and pests, but also may represent a feasible alternative of overcoming microbial resistance mechanisms.

Similar results were found by Annan et al. (2009) using friedeline, also isolated in the present work, from the methanolic extract of *Paullinia pinnata* L. roots against *S. aureus* and MRSA using the MIC on the concentration of 256 µg/mL relative to positive control using tetracycline (MIC= 128 µg/mL). However, other authors suggest that biological assays aiming toxicity at different concentrations must be carried out.

Ogunnusi et al. (2010), after isolating friedeline and friedelanol of the ethanolic extract of leaves of *Euphorbia kamerucica* Pax, performed antibacterial activity assays on the growth of *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus* on the concentrations of 100, 75 and 50 µg/mL, respectively, by agar disk diffusion technique in wells and verified after 24 hours, growth inhibition zones ranging from 9 to 10 mm for *S. aureus* and from 13 to 15 mm for *P. aeruginosa* on the concentration of 50 µg/mL. However, negative results were found in *E. coli*, where inhibition halos were not observed when compared to other tested bacteria.

Other studies reveal that with the gram-negative bacterium, *E. coli*, the substances and plant extracts are not efficient, that is, they do not present inhibition halos on the tested concentrations, pointing the fact these bacteria, besides cell wall, present an external membrane that acts as a barrier for many substances, including chemotherapeutics (NIKAIDO, 2003; YEAGLE, 2012).

This is noteworthy, since the cell walls of gram-negative bacteria are more complex than those of gram-positive, since besides having a cytoplasmic membrane and a thin layer of peptidoglycans, they also have an external membrane covering all of them. This external membrane serves as a selective barrier that regulates the passage of some substances towards inside and outside of the cell (SOARES, 2013). Similar results were found by Carvalho et al. (2014) where no antimicrobial activity

at any of the concentrations for the ethanolic and cyclohexanic extracts of *Matricaria chamomilla* against *E. coli* was observed, on both agar and broth diffusion techniques.

The fact that the substances isolated did not present antimicrobial activity against *E. coli* does not mean they are not active against other species of pathogenic bacteria tested, since other plant species have improved activity against these bacteria, being noted there is variation in sensibility for each type of substance assayed, suggesting new concentrations to be tested.

It is likely that the difference of antimicrobial activity is related not only to biological activity of the substances, but also due to the presence of one of the structures of external membrane of Gram-negative bacteria, which might prevent the passage of molecules by this membrane (FRANÇA et al., 2009), besides the particularities belonging to different resistance mechanisms of lineages.

Ribeiro & Soares (2000) stated that several factors influence the results of agar well diffusion technique, such as: presence of bacterial enzymes, medium composition, substance diffusion in the medium, inoculus density, incubation period, temperature, and stability of the substance used.

According to Estrela (2000), the method of Agar diffusion does not offer conditions for comparison between substances with distinct solubilities and diffusibilities. Analyzing substances with different dissociation and diffusion capabilities, it can be noted some tested substances did not present difficulties regarding diffusion and dissociation in agar, however, in solubility tests with DMSO, the turbidity of these substances was high, hampering the short-term solubility.

Although the exact mechanism by which the isolated substances are acting on the analyzed bacteria is unknown, it is known that substances with antimicrobial activity might interfere on protein synthesis, cell wall synthesis, cell wall degradation, and folic acid biosynthesis (BAX et al., 2000).

Conclusion

The results of this work, together with the data in literature, show clearly that *M. guianensis* is a rich source of both friedelane and quinonamethide classes triterpenes, and according to the data cited along this manuscript, the triterpenes belonging to this class have shown several biological activities, strengthening the medicinal status of this plant. Further, this work presents the first report of results that show the efficacy of the substances of *M. guianensis* on four tested ATCC bacteria using the agar well diffusion technique.

Acknowledgements

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for financial support and the Research Support Foundation of Amazonas State (FAPEAM) for granting the scholarship for the first author.

References

- ALMEIDA, M.T.R.; LUCI, C.R.; PADRÓN, J.M.; PALERMO, J.A. (2010). Antiproliferative terpenoids and alkaloids from the roots of *Maytenus vitidaea* and *Maytenus spinosa*. **Phytochemistry**, 71(14): 1741-1748.
- ALVARENGA, E.; FERRO, E.A. (2006). Bioactive triterpenes and related compounds from Celastraceae. **Studies in Natural Studies in Natural Products Chemistry**, 33(1): 239-242.
- ANNAN, K.; ADU, F.; GBEDEMA, S.Y. (2009). Friedelin: a bacterial resistance modulator from *Paullinia pinnata* L. **Journal of Science and Technology**, 29(1): 152-159.
- ANTONISAMY, P.; DURAIANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. (2011). Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. in mouse and rat models. **Journal of Pharmacy and Pharmacological**, 63(1): 1070-1072.
- BAX, R.; MULLAN, N.; VERHOEF, J. (2000). The millennium bugs – the need for and development of new antibacterials. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 16(1): 51-59.
- BORRÁS, M.R.L. (2003). **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas - Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa. Manaus: Valer.**
- CARVALHO, C.A. (2007). **Avaliação do potencial antifúngico, antioxidante e citotóxico dos extratos de *Jacaranda decurrens* cham. (carobinha).** [dissertação]. Universidade de Ribeirão Preto: USP.
- CARVALHO, A.F.; SILVA, D.M.; SILVA, T.R.C.; SCARCELLI, E.; MANHANI, M.R. (2014). Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 16(3): 521-526.
- CORDOVA, S.M.; BENFATTI, C.S.; MAGINA, M.D.A.; GUEDES, A.; CORDOVA, C.M. (2010). Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente à *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. **RBAC**, 42(4): 241-244.

CORREIA, A.F.; SEGOVIA, J.F.O.; GONÇALVES, M.C.A.; OLIVEIRA, V.L.D.E.; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J.C.T.; KANZAKI, L.T.B. (2008). Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug- resistant bacteria. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, 12(1): 369-380.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; FALCÃO, S.V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR J.P. (2009). *In vitro* interference of *Hyptis martiusii* Benth. & chlorpromazine against an aminoglycoside-resistant *Escherichia coli*. **Indian Journal Medicinal Research**, 129(1): 566-568.

CURSINO, L.M.C.; SANTOS, I.; MARIÚBA, L.A.; JEFFREYS, M.F.; LIMA, N.M.; OLIVEIRA, J.L.; ORLANDI, P.P.; NUNES, C.V. (2011). Antibacterial activity of *Minuartia guianensis* extracts and phytochemical evaluation. **Emirates Journal of Food Agriculture**, 23(6): 505-510.

DALMARCO, E.M.; GUIMARÃES, C.L.; GUEDES, A.; CALDERARI, M.T. (2007). Análise da atividade antibacteriana (*in vitro*) de plantas da flora brasileira utilizados pela medicina popular. **Revista Ciências da Saúde**, 25(1): 133-142.

DING, Y.; LIANG, C.; KIM, J.H.; LEE, Y.M.; HYUN, J.H.; KANG, H.K.; KIM, J.A.; MIN, B.S.; KIM, Y.H. (2010). Triterpene compounds isolated from *Acer mandshuri* and their anti-inflammatory activity. **Bioorganic Medicinal Chemical Letters**, 20(5): 1528-1531.

DIJPA, C.D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERC, J. (2000). Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambo* (L.) Alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 71(1): 307-313.

DUARTE, L.P.; FIGUEIREDO, R.C.; DE SOUZA, G.F.; SOARES, D.B.S.; RODRIGUES, S.B.V.; SILVA, F.C.; SILVA, G.D.F. (2010). Chemical constituents of *Salacia elliptica* (Celastraceae). **Química Nova**, 33(4): 900-903.

DUKE, J.A.; VÁSQUEZ, R. (1994). **Amazonian ethnobotanical dictionary**. Florida: CRC Press, Boca Raton.

ESTRELA, C.R. (2000). **Eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras de canais radiculares**. [dissertação]. Universidade Federal de Goiás: UFG.

FACUNDO, V.A.; MENEGUETTI, D.U.O.; MILITÃO, J.S.L.T.; LIMA, R.A.; HURTADO, F.B.; CASSEB, A.A.; TEIXEIRA, L.F.; SILVA, I.C.; SILVA, G.V.J.; JÚNIOR-LACERDA, V. (2015). Chemical constituents from *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Amazon rainforest. **Biochemical Systematics and Ecology**, 58(1): 270-273.

FIGUEIREDO, J.N.; RAZ, B.; SEQUIN, U. (1998). Novel quinone methides from *Salacia kraussii* with *in vitro* antimalarial activity. **Journal of Natural Products**, 61(6): 718-723.

FONSECA, A.P.N.D.; SILVA, G.D.F.; CARVALHO, J.J.; SALAZAR, G.D.C.M.; DUARTE, L.P.; SILVA, R.P.; TAGLIATI, C.A.; ZANI, C.L.; NEVES, T.M.A.; PERES, V.; VIEIRA-FILHO, S.A. (2007). Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. **Química Nova**, 30(4): 842-847.

FRANÇA, H.S.; KUSTER, R.M.; RITO, P.N.; OLIVEIRA, A.P.; TEIXEIRA, L.A.; ROCHA, L. (2009). Atividade antibacteriana de floroglucinois e de extrato hexânico de *Hypericum brasiliense* Choysi. **Química Nova**, 32(1): 1103-1106.

HURTADO, FB. (2013). **Contribuição ao estudo fitoquímico e biológico da entrecasca da espécie *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek**. [tese]. Universidade Federal de Rondônia: UFRO; 2013.

HUYKE, C.; LASZCZYK, M.; SCHEFFLER, A.; ERNEST, R.; SCHEMP, C.M. (2006). Treatment of actinic keratoses with birch bark extract: a pilot study. **Journal the Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, 4(1): 130-132.

KENNEDY, M.L.; LLANOS, G.G.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; BAZZOCCHI, I.L.; JIMENEZ, I.A. (2011). Terpenoides from *Maytenus* species and assessment of their reversal activity against a multidrug-resistant *Leishmania tropica* Line. **Chemical Biodiversity**, 8(12): 2291-2298.

LIMA, E.S.; VARGAS, F.S.; POHLIT, A.M. (2010). Antioxidant, antiinflammatory and antiplatelet aggregating activities of *Maytenus guianensis* bark extract. **Latin American Journal of Pharmacy**, 29(1): 1107-1012.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. (2008). **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum.

MACARI, P.A.T.; PORTELA, C.N.; POHLIT, A.M. (2006). Antioxidant, cytotoxic and UVB-absorbing activity of *Maytenus guianensis* Klotzsch (Celastraceae) bark extracts. **Acta Amazônica**, 36(4): 513-518.

MARTUCCIELLO, S.; BALESTRIERI, M.L.; FELICE, F.; ESTEVAM, C.S.; SANT'ANA, A.E.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. (2010). Effects of triterpene derivatives from *Maytenus rigida* on VEGF-induced Kaposi's sarcoma cell proliferation. **Chemical Biological Interactions**, 183(1): 450-454.

MOHAMED, F.A.; PERWEZ, A. (2014). Anti-inflammatory activity and qualitative analyses of different extracts of *Maytenus obscura* (RICH) by high performance thin layer chromatography method. **Asian Pac Journal Tropical Biomedical**, 4(2): 152-157.

MORIKAWA, T.; KISHI, A.; PONGPIRIYADACHA, M.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. (2003). Structures of New Friedelane-Type Triterpenes and Eudesmane-Type Sesquiterpene and Aldose Reductase Inhibitors from *Salacia chinensis*. **Journal of Natural Products**, 66(9): 1191-1196.

NIKAIDO, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and molecular biology reviews**, 67(4): 593-656.

NOSSACK, A.C.; VASCONCELOS, E.C.; VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M.; ROQUE, N.F. (2000). Quantitative analysis of triterpenes friedelin and friedelan-3-ol in *Maytenus aquifolium* by HRGC and HT-CGC. **Phytochemical Analysis**, 11(1): 243-246.

OGUNNUSI, T.A.; OSO, B.A.; DOSUMU, O.O. (2010). Isolation and antibacterial activity of triterpenes from *Euphorbia kamerunica* Pax., **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, 4(1): 158-167.

OLIVEIRA, D.M.; SILVA, G.D.F.; DUARTE, L.P.; VIEIRA, S.A. (2006). Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acantophylla* Reissek, Celastraceae. **Biochemical Systemy Ecology**, 34(1): 661-665.

OLIVEIRA, C.R.; SEVER, M.A.C.; DE MORAES, M.O.; DE MELO, L.V.; GOMES, A.P.; SILVA, R.L.; DOS SANTOS, M.L. (2012). Avaliação citotóxica em três linhagens de células tumorais das frações obtidas da casca do caule de *Salacia crassifolia* (MART). **Revista Ciência Química e Farmácia**, 41(2): 133-142.

OLIVEIRA, M.L.G. (2014). **Avaliação *in silico* do potencial farmacológico e toxicológico de friedelanos, lupanos e derivados de *Maytenus gonoclada* Mart.** [doutorado]. Universidade Federal de Minas Gerais: UFMG.

OSAKADA, A. (2009). **Desenvolvimento inicial de sangue-de-dragão (*Croton lechleri* MULL. ARG) sob diferentes classes de solos, corretivos e níveis de luminosidade da Amazônia Central.** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia: INPA.

PIERI, F.A.; JOSÉ, R.M.; GALVÃO, N.N.; NERO, L.A.; MOREIRA, M.A.S. (2010). Antimicrobial activity of autoclaved and non autoclaved copaiba oil on *Listeria monocytogenes*. **Ciência Rural**, 40(8): 1797-1801.

PORFÍRIO, Z.; MELO-FILHO, G.C.; ALVINO, V.; LIMA, M.R.F.; SANT'ANA, A.E.G. (2009). Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., *Lythraceae*, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19(3): 785-789.

REVILLA, J. (2002). **Apontamentos para a cosmética Amazônica.** Manaus: SEBRAE.

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R. (2000). **Microbiologia prática: roteiro e manual.** São Paulo: Atheneu.

RIBEIRO, A.Q.; MOURA, C.S. (2009). **Informações sobre plantas medicinais e fitoterápicos no contexto da farmacoterapia.** São Paulo: Atheneu.

SANTOS, L.S.; SANTOS, J.C.L.; SOUZA-FILHO, A.P.S.; CORRÊA, M.J.C.; VEIGA, T.A.M.; FREITAS, V.C.M.; FERREIRA, I.C.S.; GONÇALVES, N.S.; SILVA, C.E.; GUILHON, G.M.S.P. (2008). Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas do capim-marandu e duas variações em função do pH. **Planta daninha**, 26(3): 531-538.

SANTOS, V.A.F.F.M.; LEITE, K.M.; SIQUEIRA, M.C.; REGASINI, L.O.; MARTINEZ, I.; NOGUEIRA C.T.; GALUPPO, M.K.; STOLF, B.S.; PEREIRA, A.M.S.; CICARELLI, R.M.B.; FURLAN, M.; GRAMINHA, M.A.S. (2013). Antiprotozoal activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, 18(1): 1053-1062.

SETZER, W.N.; HOLLAND, M.T.; BOZEMAN, C.A.; ROZMUS, G.F.; SETZER, M.C.; MORIARITY, D.M.; REEB, S.; VOGLER, B.; BATES, R.B.; HABER, W.A. (2001). Isolation and frontier molecular orbital investigation of bioactive quinone-methide triterpenoids from the bark of *Salacia petenensis*. **Planta Medicinal**, 67(1): 65-69.

SILVA, F.C.; GUEDES, F.A.F.; FRANCO, M.W.; BARBOSA, F.A.R.; MARRA, C.A.; DUARTE, L.P.; SILVA, G.D.F.; VIEIRA-FILHO, S.A. (2013). Algistatic effect of a quinonamethide triterpene on *Microcystis novacekii*. **Journal of Applied Phycology**, 25(1): 1720-1723.

SOARES, A.A. (2013). **Avaliação da atividade antimicrobiana do peptídeo Ocellatin-K1 isolado da secreção cutânea de *Leptodactyllus knudseni* (Anura: Leptodactylidae)**. [graduação]. Universidade Federal de Rondônia: UFRO.

SOUSA, G.F.; DUARTE, L.P.; ALCANTARA, A.F.C.; SILVA, G.D.; VIEIRA-FILHO, A.S.; SILVA, R.R.; OLIVEIRA, D.M.; TAKAHASHI, J.A. (2012). New triterpenes from *Maytenus robusta*: structural elucidation based on NMR experimental data and theoretical calculations. **Molecules**, 17(11): 1349-1356.

SPIVEY, A.C.; WESTON, M.; WOODHEAD, S. (2002). Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. **Chemical Society Review**, 31(1): 43-59.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.B.; NEPOMUCENO, D.C.; YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D. (2006). Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts Clusiaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 101(3): 287-290.

YEAGLE, P.L. (2012). **The structure of biological membranes**. 3.ed. New York: CRC.

***Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK (CELASTRACEAE) AND ITS
ETHNOPHARMACOLOGICAL POTENTIAL**

Renato Abreu Lima^{1,2}; Fernanda Bay-Hurtado²; Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti^{2,3}; João Bezerra Facundo²; Júlio Sancho Linhares Teixeira Militão²; Valdir Alves Facundo^{1,2}

¹Postgraduate Program in Biodiversity and Biotechnology, Federal University of Amazonas, Bionorte Network; ²Laboratory of Research in Chemistry of Natural Products, Federal University of Rondônia; ³College of Application (CAP) of the Federal University of Acre (UFAC), Rio Branco, Acre, Brazil.

*E-mail: renatoabreu07@hotmail.com

ABSTRACT

This study consists of a literature review on the traditional use of the medicinal plant *Maytenus guianensis*, which was carried out using the databases: LILACS, SciELO, and PubMed. *M. guianensis* is popularly known as xixuá and occurs throughout the tropical and subtropical band of the world. In Brazil, its leaves, bark, and roots are used as tea or macerated for the treatment of inflammation and infections in general. It is also popularly used to treat rheumatism and worm infections. These medicinal uses which have experimental support seem to be mainly associated with the presence of triterpenes.

KEYWORDS: *Maytenys guianensis*, xixuá, triterpenes.

RESUMO

O presente trabalho constitui-se de uma revisão bibliográfica sobre o uso tradicional da planta medicinal *Maytenus guianensis* na qual foram utilizadas as bases de dados: LILACS, SciELO e PubMed. *M. guianensis* é conhecida popularmente como xixuá e ocorre em toda a faixa tropical e subtropical do mundo. No Brasil, suas folhas, cascas e raízes são utilizadas em forma de chá ou maceração no tratamento de inflamações e infecções em geral. Outras doenças e condições em que acha emprego popular incluem reumatismo e verminoses. Esses usos medicinais que têm apoio experimental parecem associados principalmente à presença de triterpenos.

Palavras-chave: *Maytenys guianensis*, xixuá, triterpenos.

SYNONYMY

Chichuá, xixuá, chuchahuasi, chucchu huashu, chuchuasi, chuchasha, and tonipulmon (Borrás, 2003; Ducke; Vasquez, 1994; Revilla, 2002).

USED PARTS

The leaves, roots, and barks are mainly used, but all parts of *M. guianensis* may be used in traditional medicine. This plant also has nutritional value and it is used in seasonings (Revilla, 2002). In addition, the red powder of the root bark of this plant is used by indigenous people (Sousa, 1986). Its roots and stems are also used to treat infections and inflammations in general (Borrás, 2003).

GEOGRAPHIC DISTRIBUTION

In the Amazon, there are numerous species of plants with medicinal properties (Osakada, 2009), including the Celastraceae family, which consists of 98 genera and approximately 1,264 species (Fonseca et al., 2007, Lorenzi; Matos, 2008; Oliveira et al., 2012), distributed in different parts of the world, particularly in tropical and subtropical regions, including North Africa, South America and Asia (Spivey; Weston; Woodhead, 2002; Duarte et al., 2010; Hurtado, 2013; Mohamed; Perwez, 2014).

Maytenus is the largest and most diverse genus of the Celastraceae family and it is included in the Celastroideae subfamily, Oxphylla section, which is restricted to South America (Carvalho-Okano; Leitão-Filho, 2005). This genus has about 200 tropical species; among these, 76 species and 14 varieties are found in Brazil, mainly in the South region (Negri; Possamai; Nakahima, 2009). Specimens of this genus are found in the Amazon forest, Atlantic forest, Cerrado (Brazilian savanna), Restinga (forest on sandbank along the coastal), Caatinga, and campo rupestre (rocky field). *Maytenus guyanensis* is an endemic tree of solid land, found in some areas of the Amazon forest, mainly in Peru, Ecuador and Colombia (Borrás, 2003; Ducke; Vasquez, 1994; Revilla, 2002).

BOTANICAL DESCRIPTION OF THE PLANT

The leaf of *M. guyanensis* is oblong-lanceolate or elliptical, entire, acuminate, coriaceous, and glossy on the upper surface, with 10 – 20 cm length and 3 – 4 cm width, cartacea, prominent central and inconspicuous secondary vein on both surfaces; this plant has apex acuminate to cuspidate with petiole of 4 mm width, inflorescence axillary, numerous minute pentamerous flowers, colorful calyx with deciduous teeth and white obovate petals, its fruit is an ovoid capsule, with oblong seeds with white arils (Revilla 2001; 2002). The stem is cylindrical with fluted base. It has yellowish brown furrowed rhytidome; detachment in papyraceous plates (Ribeiro et al., 2009).

MICROSCOPIC CHARACTERISTICS

The structure of the secondary growth root has distinct growth layers, bounded by marginal parenchyma bands, distributed at regular intervals. It has vessels of diffuse distribution, uniform, circular section, with a thin wall; an average of 2.44 μm thick, solitary pores, and tangential diameter of 20 - 29 micrometers (Prata, 2007). Although Metcalfe; Chalk (1957) mentions that the vessels of the roots of the Celastraceae family often contain tylose, it was not observed in the root vessels of *M. guianensis*. Vessel elements with and without appendages were found, such appendages were present at both ends. The intervessel pits are alternate and bordered; the axial parenchyma is apotracheal in transversal section and in bands (Prata, 2007).

The periderm of the species belonging to the Celastraceae family originates in the subepidermal layers. The cells of this layer suffer periclinal divisions, producing phellogen cells towards the periphery, and phelloderm towards inward. This behavior corroborates the observations of Solereder (1908) and Metcalfe; Chalk (1957) to *Maytenus* genus.

The lenticels have filling tissue composed of about 20 layers of juxtaposed cells (Glória; Guerreiro, 2006).

According to Glória & Guerreiro (2016), because of this continuity of intercellular spaces and the internal tissues of the axial organ, it is supposed that the function of the lenticels is related to the exchange of gasses. The developed periderm consists of a relatively thick phellem composed about 30 layers of tabular cells naturally colored with two color patterns: reddish brown and dark brown. Sequentially, it is observed the phellogen and a phelloderm with 4 rows of cells with natural yellowish brown color.

As described by Glória & Guerreiro (2006), phellem cells are typically devoid of visible content, however in some cases, it is possible to observe the accumulation of resin or phenolic compounds. In cross-section, the phellogen cells are rectangular, radially flattened with a compact arrangement, which is observed in *M. guianensis*.

The phelloderm consists of active parenchyma cells, similar to the cortical parenchyma and may be distinguished from the other cells according to their alignment with the phellogen cells. The cortex has cells with a rounded shape, surrounded internally by fibers and several stone cells (Prata, 2007).

FOREMOST CHEMICAL COMPONENTS

According to Lima et al. (1969), who were the first researchers to devote themselves to *Maytenus* spp. phytochemical studies, this species presented several phytochemical groups; the most prominent were terpenoids, alkaloids, tannins, macrolides, and flavonoids, among others (Coimbra, Da Silva, 1958; Carlini; Frochtengarten, 1988; Alonso, 1998; Santos-Oliveira et al., 2009; Simões, 2007; Estevam et al., 2009). The presence of these groups was later confirmed, and their therapeutic potential is well known.

The heartwood (Pinheiro, 1990), bark (Sousa et al., 1986; Macari; Portela; Pohlit, 2006; Lima; Vargas; Pohlit, 2010), and inner bark (Hurtado, 2013) of *M. guianensis* have been already studied. In his dissertation Pinheiro (1990) conducted a study on the heartwood ethanolic extract of this species, resulting in the isolation of the following secondary metabolites: dulcitol, N-dimethyl serine, β -sitosterol, β -sitostenone, 3,7-dioxo-friedelane, proanthocyanidin A, and 4'-O-methyl - (-) - epigallocatechin. Sousa et al. (1986) carried out a study on the root ethanolic extract and they isolated the wilfordine and evonine sesquiterpene alkaloids.

Macari; Portela; Pohlit (2006) performed a chemical study on the bark ethanolic extract of *M. guianensis*, resulting in the isolation of the flavonoid 4-methyl epigallocatechin; and finally, Hurtado (2013) conducted a phytochemical study on its inner bark, which resulted in the isolation of six pentacyclic triterpenes: 3-oxofriedelane, 3 β -hydroxyfriedelane, 3-oxo-16 β -hydroxyfriedelane, 3-oxo-29-hydroxyfriedelane, tingenone and tingenine B.

Phytochemical studies on leaves, stem barks, and roots of *M. guianensis* led to the isolation and identification of the following terpenoids: five friedelane (friedeline, friedelol, 16 β -friedeline, 29-hydroxyfriedeline and 3,7-friedelodione), one β -amerine oleanane, one α -amerine ursane, and three friedo-nor-oleanane (quinine-methides) (tingenone, 22-hydroxy-tingenone and 22-hydroxy-pristimerine). In addition, two steroids (β -sitosterol and sitostenone), one sesquiterpene alkaloid (N,N-dimethylserine) (SOUSA et al, 1986; FACUNDO et al, 2015), and one flavonoid (4-methyl-epigallocatechine (MACARI et al., 2004) were also identified.

MEDICINAL USES

The red powder of the root bark of *M. guianensis* is used by indigenous people as an alcoholic infusion as a general tonic, for the treatment of rheumatism, as contraceptive and aphrodisiac. For the topical use, it is used as an antitumor agent for skin cancer, as well as for the treatment of wounds (Da Silva, 1990).

Its roots and stems are also used as an analgesic, anti-inflammatory, aphrodisiac, muscle relaxant, anti-rheumatic and anti-diarrheal. This species is also indicated for the treatment of arthritis, sexual impotence, colds, bronchitis, hemorrhoids, worm infections, lumbago, external ulcers, and gynecological purposes (Borrás, 2003). As a cosmetic it is used in skin rashes and to prevent the skin cancer (Revilla, 2002).

As tincture it is used as a muscle relaxant, to treat arthritis and rheumatism; as decoction a part of the bark is used (about 2 to 5 centimeters in 2 liters of water); to treat arthritis and rheumatism it was reported a cup (coffee) three times a day for a week (Borrás, 2003). The decoction of the branches is considered a stimulant and tonic (Ducke; Vasquez, 1994). Moreover, it is used for antiparasitic action (Macari; Portela; Pohlit, 2006), demonstrating a great ethnopharmacological potential to be explored.

MEDICINAL PROPERTIES SUPPORTED BY SCIENTIFIC EVIDENCE

In recent years, there has been a significant increase in the interest in plants belonging to the *Maytenus* genus, especially in Brazil, which has nearly 40% of all known species (Carvalho-Okano; Leitão-Filho, 2004), which occur in the North (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima), Northeast (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte,

Sergipe), Midwest (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Southeast (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo), and South region of this country (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina), with some species used in traditional medicine.

Maia et al. (2009) identified by the platelet aggregation test that the dry extract of *M. guianensis* bark showed mediated inhibition of aggregation of 26% at a concentration of 200/ ml^{-1} and 77% at a concentration of 400 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, making possible the use of this species for pharmacological purposes.

ANTI-LEISHMANIA ACTIVITY

Macedo et al. (2015) reported that an isolated triterpene of *M. guianensis* incorporated into microparticles in solution proved to be highly toxic to the parasites, according to the IC-50 value. When it was encapsulated in the microparticles, it maintained its activity anti-leishmania, but in a more attenuated way and sustained over time, suggesting that the developed microparticles have the potential of a modified release system for subsequent intracellular delivery of the triterpene to eliminate amastigotes.

ANTIMALARIAL ACTIVITY

The *M. guianensis* extracts showed a good *anti-P. falciparum* activity in HRPII trials and the most active result was for EAMG with IC50 of 190.37 $\eta\text{g}.\text{mL}^{-1}$, and the less active result for EHMG with IC-50 of 305.23 $\eta\text{g}.\text{mL}^{-1}$ (Hurtado, 2013; Meneguetti et al., 2014a).

ANTIOXIDANT ACTIVITY

Hurtado (2013) evaluated the antioxidant activity of the “on bark” of *M. guianensis*, and found significant difference $p < 0.05$, with a percentage of antioxidant activity higher than the standard value, used at a concentration of 200 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ in the hexane eluate (94.91 %) and chloroform eluate (96.11%), concentration of 150 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ in acetone extract (95.93%), hexane eluate (95.59%), chloroform eluate (94.53%) and acetone eluate (94.70%), whereas in the other 117 tested concentrations this same behavior was not verified, comparing the values with the commercial standard *Ginkgo biloba* (Egb 761), indicating the potential of this species.

The values obtained for CE50 with acetone extract of the inner bark (50.44 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) and acetone eluate (49.52 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) are the closest values in comparison with the values obtained with the extract of *G. biloba* (46.62 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), this fact is probably due to the presence of antioxidant substances, which reveals a promising antioxidant activity of the studied species.

ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY

Hurtado (2013) showed significant antiedematogenic effect by administering (via i.p.) the acetone extract of the stem inner bark (EAMG), hexane - 135 - eluate (EHMG), chloroform eluate (ECIMG), acetone eluate (EAcMG), CQH-2 and CQH-3 of *M. guianensis*, using the paw edema test in mice with 1% carrageenan.

The results obtained after administering the EAMG, EHMG, ECIMG, CQH-2 and CQH-3 of *M. guianensis* showed that the doses, tested at the evaluated time, were effective to inhibit the formation of edema, with a higher efficacy for EAMG and CQH-3, notably by administering CQH-3, which resulted in an inhibition of 65% in the volume of edema formation at a time of 120 minutes with a dose of 50 mg/kg.

CYTOTOXIC AND MUTAGENIC ACTIVITY

The data show that the aqueous extract of *M. guianensis* has cytotoxic effect at concentrations of 77 and 192mg/mL ($p < 0.001$), (Meneguetti et al., 2014b; 2015). What is not worrying because these concentrations are, respectively, 20 times more concentrated than the common concentration (3.85mg/ml) used by the population (Camparoto et al., 2002).

The only treatment that showed mutagenic effect was those with 192mg/ml ($P < 0.001$) (Meneguetti et al., 2014b). It was observed at this concentration some anaphasic bridges which are changes that occur because of the mutagenicity (Sturbelle et al., 2010). Thus, the study carried out by Meneguetti et al. (2014b) demonstrated, in *A. cepa* cells, safety regarding the cytotoxic and mutagenic effects in concentrations up to 10 times higher than those used in the traditional use of *M. guianensis*. The same was also observed in mammals as it was found that aqueous extract of *M. guianensis* in concentrations up to tenfold higher than the concentration used in ethnopharmacology does not present genotoxic effects and, moreover, it has antigenotoxic actions in mice treated acutely (Meneguetti et al., 2014b).

ANTIMICROBIAN ACTIVITY

Pioneering studies such as the one performed by Lima et al. (1969) have already demonstrated that the maitenin has strong antimicrobial activity against many gram-positive bacteria. These effects were corroborated by demonstrating that extracts of leaves and roots have antimicrobial effect for several pathogens, including *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* sp..

Annak et al. (2009) confirmed that the gallic tannins can inhibit the growth of bacteria by changing the selective permeability of the cell wall. Tannins from the catechin have *in vivo* and *in vitro* activity against *H. pylori* (Mabe et al., 1999). According to Singh; Dubey (2001), the friedelin and

friedelan3-B-ol have *in vitro* antimicrobial activity against *S. aureus*, *Escherichia coli*, and also against the fungus *Aspergillus niger*.

OTHER EFFECTS

The triterpenes, in particular, the friedelin, have anti-inflammatory activity, reducing the edema induced in mice paws by carrageenan (Shmizu; Tomoo, 1994). These effects may explain, in part, the analgesic action found by Gonzales et al. (2001) with the compression test of mice tail.

The friedelin and other triterpenoids of the *Maytenus* genus inhibit the aldose reductase enzyme; this activity is weak in isolated compounds, but consistent in triterpene fractions. This enzyme is responsible for the excess synthesis of sorbitol in diabetics, a mechanism that implicates in complications such as the peripheral neuropathy of this disease (Chavez et al., 1998).

FINAL CONSIDERATIONS

M. guianensis is an important phytotherapeutic in folk medicine, mainly due to its anti-inflammatory activity and general infections. Therefore, this study intends to offer support to the study on the xixuá's ethnopharmacological properties, as well as point out the benefits of its use, showing the importance of the scientific research on the various medicinal properties that this species may offer.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thanks the CNPq for financial support and the Research Support Foundation of Amazonas State (FAPEAM) for granting the scholarship.

REFERENCES

- Alonso JR. Tratado de fitomedicina bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires, Isis Ediciones SRL, 1998. p. 828-834.
- Annan K, Adu F, Gbedema SY. Friedelin: a bacterial resistance modulator from *Paullinia pinnata* L. Journal of Science and Technology, 2009; 29(1): 152-159.
- Borrás MRL. Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas - Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa. Manaus: Valer, 322pp. 2003.
- Camparoto ML, Teixeira RO, Mantovani MS, Vicentini VEP. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. Genetics and Molecular Biology, 2002; 25(1): 85-89.
- Carlini EA, Frochtengarten ML. Toxicologia clínica (Fase I) da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). Brasília- Distrito Federal, 1988. p.67-73.

- Carvalho-Okano RM, Leitão-Filho HF. O gênero *Maytenus* (Celastraceae) no Brasil extra-amazônico. In: Reis MS, Silva SR. Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas. *Maytenus* spp. IBAMA, Brasília, 2004.
- Carvalho-Okano RM, Leitão-Filho HF. O gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) no Brasil extra-amazônico. In: Conservação e uso sustentável de Espinheira Santa, Volume Único, 2005. p.11-51,
- Chávez H, Estévez-Braun A, Ravelo AG, González AG. First examples of dammarane triterpenes isolated from Celastraceae. *Tetrahedron*, 1998; 53(18): 6465-6472.
- Coimbra R, Da Silva ED. Notas de Fitoterapia. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958. p.32-33.
- Duarte LP, Figueiredo RC, De Souza GF, Soares DBS, Rodrigues SBV, Silva FC, Silva GDF. Chemical constituents of *Salacia elliptica* (Celastraceae). *Química Nova*, 2010; 33(4): 900-903.
- Duke JA, Vásquez R. Amazonian ethnobotanical dictionary. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1994. 114p.
- Estevam CS, Cavalcanti AM, Cambui EVF, Araújo-Neto V, Leopoldo PTG, Fernandes RPM, Araújo BS, Porfírio Z, Sant'ana AEG. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart (Celastraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2009; 19(1): 299-303.
- Facundo VA, Meneguetti DUO, Militão JSLT, Lima RA, Hurtado FB, Casseb AA, Teixeira LF, Silva IC, Silva GVJ, Júnior-Lacerda, V. Chemical constituents from *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Amazon rainforest. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015; 58(1): 270-273.
- Fonseca APND, Silva GDF, Carvalho JJ, Salazar GDCM, Duarte LP, Silva RP, Tagliati CA, Zani CL, Neves TMA, Peres V, Vieira-Filho SA. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. *Química Nova*, 2007; 30(4): 842-847.
- Gonzalez FG, Portela TY, Stipp EJ, Di Stasi LC. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifoliuim*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. *Journal Ethnopharmacology*, 2001; 77(1): 41-47.
- Glória B, Guerreiro S. Anatomia vegetal. 2.ed. Viçosa: Editora da UFV, 2006. 438p.
- Hurtado FB. Contribuição ao estudo fitoquímico e biológico da entrecasca da espécie *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek. [tese]. Universidade Federal de Rondônia: UFRO; 2013.
- Lima OG, Coelho JSB, Weigert E, D'albuquerque IL, Souza MAM. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. *Revista do Instituto de Antibióticos*, 1969; 9(1): 17-25.
- Lima ES, Vargas FS, Pohlit AM. Antioxidant, antiinflammatory and antiplatelet aggregating activities of *Maytenus guyanensis* bark extract. *Latin American Journal of Pharmacy*, 2010; 29(1): 1107-1012.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008.

Macedo SRA, De Barros NB, Ferreira AS, Meneguetti DUO, Facundo VA, Nicolete R. Avaliação da atividade antileishmania de um triterpeno isolado de *Maytenus guianensis* incorporado em micropartículas biodegradáveis de PLGA. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 51, Anais... Fortaleza: CE, p.10, 2015.

Mabe K, Yamada M, Oguni I. *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 1999; 43(1): 1788-1791.

Maia BL, Lima BS, Vasconcelos MC. Avaliação da atividade hemolítica, coagulante e antiagregante plaquetária do extrato seco da casca de *Maytenus guianensis*. In: Sociedade Brasileira Para o Progresso da Ciência, 61, Anais... Manaus: AM, 2009.

Macari PAT, Portela CN, Pohlit AM. Antioxidant, cytotoxic and UVB-absorbing activity of *Maytenus guianensis* Klotzsch (Celastraceae) bark extracts. Acta Amazônica, 2006; 36(4): 513-518.

Meneguetti DUO, Cunha RM, Lima RA, Oliveira FAS, Medeiros DSS, Passarini GM, Medeiros PSM, Militão JSLT, Facundo VA. Antimalarial ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2014a; 35(4): 577-587.

Meneguetti DUO, Lima RA, Pagotto R, Facundo VA. Análise citotóxica e mutagênica do extrato aquoso de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazônico. Ciência e Natura, 2014b; 36(3): 301-309.

Meneguetti DUO, Lima RA, Silva FC, Passarini GM, Facundo JB, Pagotto RC, Militão JSLT, Facundo V.A. Acute genotoxicity analysis *in vivo* of the aqueous extract of *Maytenus guianensis* Amazonian chichuá. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2015; 25(2): 164-169.

Meneguetti DUO, Facundo VA. Análise genotóxica e antiparasitária de extratos e substâncias isoladas de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae), Chichuá (Xixuá) Amazônico. Revista Pan-Amazônica de Saúde, 2015; 6(4): 69-70.

Metcalf CR, Chalk L. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stems and wood in relation taxonomy with notes in economic uses. 2.ed. Oxford: Clarendon Press, 1957. 397p.

Mohamed FA, Perwez A. Anti-inflammatory activity and qualitative analyses of different extracts of *Maytenus obscura* (RICH) by high performance thin layer chromatography method. Asian Pac Journal Tropical Biomedical, 2014; 4(2): 152-157.

Negri MLS, Possamai JC, Nakashima T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2009; 19(2): 553-556.

Oliveira CR, Sever MAC, De Moraes MO, De Melo LV, Gomes AP, Silva RL, Dos Santos ML. Avaliação citotóxica em três linhagens de células tumorais das frações obtidas da casca do caule de *Salacia crassifolia* (MART). *Revista Ciência Química e Farmácia*, 2012; 41(2): 133-142.

Osakada A. Desenvolvimento inicial de sangue-de-dragão (*Croton lechleri* MULL. ARG) sob diferentes classes de solos, corretivos e níveis de luminosidade da Amazônia Central. [dissertação]. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia: INPA; 2009.

Pinheiro JA. Análise da Constituição Química da Madeira de *Maytenus guianensis* Klotzch. [dissertação]. Universidade Federal de Minas Gerais: UFMG; 1990.

Prata RR. Aspectos anatômicos e etnofarmacológicos do caule e raiz de *Maytenus guyanensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae). [dissertação]. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia: INPA; 2007.

Revilla J. Apontamentos para a cosmética Amazônica. SEBRAE-INPA, Manaus, Amazonas, 2002. 445p.

Ribeiro AQ, Moura CS. Informações sobre plantas medicinais e fitoterápicos no contexto da farmacoterapia. In: *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas*, 328p. 2009.

Santos-Oliveira R, Couland-Cunha S, Colaco W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart., Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2009; 19(2): 650-659.

Shimizu M, Tomoo T. Anti-inflammatory constituents of topically applied drugs V: constituents with anti-inflammatory from Aoki (*Aukuba japonica* Thumb.). *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 1994; 17(1): 665-667.

Singh B, Dubey MM. Estimation of triterpenoids from *Heliotropium maifolium* Kohen ex Retz *in vivo* and *in vitro*: antimicrobial screening. *Phytotherapy Research*, 2001; 15(1): 231-234.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. 1002 pg. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC/ Editora da UFRGS. 2007.

Spivey AC, Weston M, Woodhead S. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. *Chemical Society Review*, 2002; 31(1): 43-59.

Solereider H. *Systematic anatomy of the dicotyledons II*. Oxford: Clarendon Press, 1908. p.874-880.

Sousa JR, Pinheiro JA, Ribeiro EF, Souza E, Maia GS. A sesquiterpene evoninoate alkaloid from *Maytenus guianensis*. *Phytochemistry*, 1986; 25(7): 1776-1778.

Sturbelle R, Pinho DS, Restani RG, Oliveira GR, Garcias GL, Martinho-Roth MG. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2010; 20(3): 409-415.

**Approach Phytochemistry of Secondary Metabolites of *Maytenus guianensis* Klotzsch Ex Reissek
(Celastraceae)**

**Abordagem Fitoquímica de Metabólitos Secundários em *Maytenus guianensis* Klotzsch Ex
Reissek (Celastraceae)**

Renato Abreu Lima^{1,4*}; Fernanda Bay-Hurtado^{2,4}; Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti^{3,4}; João Bezerra Facundo⁴; Júlio Sancho Linhares Teixeira Militão⁴; Valdir Alves Facundo^{1,4}

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Rede BIONORTE, UNIR, Câmpus- BR 364, Km 9,5 CEP: 76808-659 - Porto Velho – RO,
*renatoabreu07@hotmail.com

²Pesquisadora, UNIR, Departamento de Zootecnia, Câmpus de Presidente Médici, Rua da Paz, nº. 4376 – Bairro Lino Alves Teixeira - CEP: 76.916-000 - Presidente Médici – RO, fernandabay@unir.br

³Colégio de Aplicação (CAp) e Laboratório de Fisiofarmacologia da Universidade Federal do Acre (UFAC), Rio Branco, Acre, Brasil;

⁴Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais (LPQPN), Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Câmpus BR 364 Km 9,5 CEP: 76808-659 – Porto Velho – RO

Abstract

The Brazilian Amazon rainforest, even for its richness and biological diversity, can offer the opportunity for innovative and efficient discovery of molecules with potential use in large scale. The interest in secondary metabolites have grown tremendously in recent years due to its wide use as raw material in the preparation of substances with biological activity. Specifically in relation to plants producing amazonian essential oils and plant extracts, the *Maytenus guianensis* is a shrub native to our region, being popularly known as fruit-Werewolf. The leaves are used as anti-inflammatory and infections is also indicated in the treatment of arthritis and hemorrhoids. Thus, the present study aimed to identify the classes of secondary metabolites from the ethanol extract of the leaves, stems and bark of *M. guianensis*. We carried out the identification of secondary metabolites with plant extract using specific reagents alkaloids, glycosides cardiotonic, coumarins, flavonoids, tannins, saponins and triterpenes, based on coloration and precipitation. It was found that all the studied structures show botanical alkaloids, coumarins, flavonoids and tannins using any specific reagents. However, the absence of a secondary metabolite cardiotonic glycoside was found in most of the tested reagents. The results of this study revealed that this species has secondary metabolites which can serve as raw

material for synthesis of bioactive substances, particularly drugs and are used in many preparations to benefit human health, such as in the production of food and biological activity against microorganisms.

Keywords: *Maytenus*. Celastraceae. Triterpenes.

Resumo

A Floresta Amazônica Brasileira, devido sua riqueza e diversidade biológica, pode oferecer a oportunidade para descobertas de inovadoras e eficientes moléculas com potencial de uso, em larga escala. O interesse em metabólitos secundários tem crescido muito nos últimos anos, devido à sua ampla utilização como matéria-prima na preparação de produtos ou formulações com atividade biológica, especificamente em relação às plantas amazônicas produtoras de óleos essenciais e extratos vegetais. *Maytenus guianensis* é uma árvore nativa da região Norte, sendo conhecido popularmente como chichuá. Suas folhas são utilizadas como anti-inflamatório, no tratamento de infecções, artrite e hemorroidas. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo identificar as classes de metabólitos secundários do extrato etanólico dos talos, folhas e cascas de *M. guianensis*. Realizou-se a identificação de metabólitos secundários com o extrato da planta utilizando reagentes específicos de alcaloides, glicosídeos cardiotônicos, cumarinas, flavonoides, taninos, saponinas e triterpenos, reações de precipitação e coloração. Verificou-se que todas as estruturas botânicas estudadas apresentaram alcaloides, cumarinas, flavonoides e taninos utilizando todos os reagentes específicos. Porém, a ausência do metabólito secundário glicosídeo cardiotônico foi verificado na maioria dos reagentes testados. Os resultados obtidos neste estudo revelaram que a espécie estudada apresenta metabólitos secundários que podem servir como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, além de serem utilizados em diversos preparos para benefício na saúde humana, como na produção de alimentos e na atividade biológica contra microrganismos.

Palavras-chave: *Maytenus*. Celastraceae. Triterpenos.

1 Introduction

The Brazil is recognized as one of the most expressive biodiversity of the biosphere and plays a very important role in human welfare and health, by providing basic goods and ecosystem services. With over 55,000 described species, which corresponds to 22 % of the world total, this rich biodiversity is known for harboring many species of plants, used over time in medicine, and it is directly related to the associated traditional knowledge. Approximately 48% of the drugs used in therapy arise, directly or indirectly, from natural products, especially medicinal plants (ALHO, 2012).

Natural products with antimicrobial activity, from plant or microbial, have a prominent importance in bioprospecting research since the antibiotics available in the market are increasingly ineffective due to the emergence of resistant strains, which has become a global concern (ANDRADE, 2009). Thus, several studies have been conducted aiming the use of natural products as a source of active substances against pathogenic bacteria (DAS et al., 2007; ZILBERG et al., 2004).

The Amazon forest stands out with the highest floristic diversity of the world, but there are few studies on its chemical and pharmacological potential. Thus, this forest has several plant and microbial

species that may contain non-described secondary metabolites or therapeutic potential that was not studied yet, and that could be used against various diseases, especially regarding diseases caused by bacterial agents (TANAKA et al., 2005).

The Celastraceae family comprises about 98 genera and about 1,264 species and it may be found throughout Brazil (OLIVEIRA et al., 2006; FONSECA et al., 2007). There are several studies that demonstrate that the principles of the biological interest are associated with flavonoids, sesquiterpenes, alkaloids, and pentacyclic triterpenes (GONÇALVES et al., 2005; MICHELIN et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006).

Maytenus guianensis is a small size tree endemic of solid ground in the Amazon; this plant is known as chichuá, xixuá, chuchahuasi, chucchu huashu, chuchuasi, chuchasha and tonipulmon (DUKE; VÁSQUEZ, 1994; REVILLA, 2002).

Its roots and stems are also used as an analgesic, anti-inflammatory, aphrodisiac, muscle relaxant, anti-rheumatic and anti-diarrheal. The tea and ointment, made from the leaves of the species, are also indicated for the treatment of arthritis, sexual impotence, colds, bronchitis, hemorrhoids, worm infections, lumbago, external ulcers, and gynecological purposes (BORRÁS, 2003). As a cosmetic it is used in skin rashes and to prevent the skin cancer (REVILLA, 2002), furthermore, it has antiparasitic action (MACARI; PORTELA; POHLIT, 2006), demonstrating a great ethnopharmacological potential to be explored.

Therefore, this study aimed to identify the secondary metabolites of botanical structures (leaves, bark and stems) of ethanol extracts of *M. guianensis*.

2 Method

2.1 Plant collection

The phytochemical study of the *M. guianensis* (leaves, bark and stems) was carried out at the Research Laboratory of Chemistry of Natural Products (LPQPN) of the Federal University of Rondônia (UNIR) in Porto Velho, Rondônia State, Brazil. The collection of the fresh bark of *M. guianensis* was conducted in the Adolpho Ducke Forest Reserve, located at the km 26 in the highway Manaus-Itacoatiara (AM-010), Manaus, Amazonas State, at the geographic coordinates 0°10'S, 67°05' W, in 2010 summer season. The botanical identification was performed by sending a voucher specimen to the Herbarium of the National Institute for Amazonian Research (INPA), where it was registered under the number 188,485 and identified by the researcher Dr. José Eduardo da Silva Ribeiro.

2.2. Phytochemical study

The leaves, bark and stems were adequately dried in an electric oven with air circulation at a temperature of 50 °C for 48 hours. Subsequently, they were ground to further increase the contact surface, then, the obtained material was subjected to three extractions by percolation with 95 % ethanol (P.A.) at room temperature for three days, each. After the ethanol evaporation, we obtained the ethanolic extract called MGCE. Phytochemical tests were performed with the ethanol extract, based on precipitation and coloration of the extracts diluted in specific solution and reagents for each test as Matos (2009):

Alkaloids

To perform the assay we used 2.0 mL of the ethanolic solution is added 2.0 mL of hydrochloric acid (10 %), which heated the mixture for 10 minutes. After cooling, the extract was divided into three test tubes and placed in eight drops using Pasteur pipette, the reagents following recognition:

Tube 1 - Reactive Mayer: watching white precipitate formation or light white haze;

Tube 2 - Reactive Dragendorff: watching precipitate formation of orange color red;

Tube 3 - Reactive Wagner: observing orange color precipitate formation.

Glycosides cardiotonic

A 2.0 mL solution of the extract was added 3.0 mL of lead acetate solution 10 % and 2.0 mL of distilled water. Heated the mixture in a water bath for 10 minutes. Then the extract was filtered and stirred with 10.0 mL of chloroform, the chloroform phase separated in 4 test tubes. After evaporation of chloroform, the formation of residues in the tubes, which were added the following reagents:

Tube 1: was performed Salkowski reaction for the determination of steroidal nucleus. going from yellow color to purple is a positive result.

Tube 2: 1.0 mL of Reactive Kedde. Pink or blue-violet to visible indicates cardenolide the bufadienólidos not react. The color attenuates within minutes.

Tube 3: the reaction was carried out Keller-Kiliani (glacial acetic acid in a drop III ferric chloride to 5 % methanol and concentrated sulfuric acid). intense staining is positive.

Tube 4: This was the Liebermann-Burchard reaction (1.0 mL of sample / few drops of acetic acid + 3.0 mL acetic anhydride / sulfuric acid (50: 1, v / v) Positive Result: Coloring green, blue-green, purple blue.

Tube 5: This was the reaction Baljet (1.0 mL of sample / eight drops of acetic acid + 3.0 mL of chloroform). Positive result: orange color, purple or red.

Tube 6: This was Raymond reaction (the extract is filtered and added 2 drops of ferric chloride solution of 10 % + two drops of lead acetate to 10 %). Positive result: color ranging from yellow to purple.

Coumarins

In a test tube was placed 2.0 mL of the ethanolic solution, capped with filter paper soaked in 10 % solution of NaOH and brought to a water bath at 100 ° C for some 10 minutes. It was removed and the filter paper was examined under ultraviolet light. The yellow or green fluorescence indicates the presence of coumarins.

Flavonoids

This study is based on the modification of the structure of the flavonoid in the presence of acid. Was placed in a tube, 2.0 mL ethanolic extract being added two drops of 10 % lead acetate. The presence of a colored precipitate indicates positive aspects of the reaction

Tannins

The 2.0 mL of the ethanol extract was added 10 mL of distilled water. They were filtered and were added two drops using a Pasteur pipette, the 10 % ferric chloride solution. blue color indicates possible presence of hydrolysable tannins and green staining tannins.

Saponins

In this assay, with 2.0 mL of ethanolic solution, was added 5.0 mL of boiling distilled water. After cooling, stirred vigorously, leaving at rest for 20 minutes. It is classified by the presence of saponins foaming.

Triterpenes

In this assay, with 2.0 mL of ethanolic solution, was added 5.0 mL of chloroform. After filtration, the extract was divided into two portions. In each tube there were the Liebermann-Burchard reactions and Salkowski. The triterpenes develop color and stable steroids develop color changing with time

3 Results and Discussion

3.1 Collection and preparation of botanical structures

After processing, the botanical structures provided the following quantities fresh materials and dried materials, which demonstrated sufficient sample for ongoing research (Table 1):

Table 1: Botanical structures collected to yield the extract, fresh weight and dry weight

Plant material	Weight fresh (g)	Weight dry (g)	Extract yield (mL)
----------------	------------------	----------------	--------------------

Leaves	1.122,67	506,15	50
Bark	2.030,44	379,16	75
Stems	909,32	290,75	53

Species of Celastraceae family, highlighting the gender *Maytenus*, has been the subject of numerous phytochemical investigations and many secondary metabolites have biological activities. The major classes of metabolites include those described pentacyclic triterpenes and friedelânicos quinonamethide, sesquiterpenes, secofriedelanos, steroids, agarofurânicos derivatives, glycosides, proanthocyanidins, flavonoids glycosides, sesquiterpene alkaloids pyridine and catechins (HURTADO, 2013).

3.2 Identification of secondary metabolites of botanical structures

The secondary metabolites found in the leaves were for alkaloids, glycosides cardiotoxic using Salkowski reagents, Keller-Killiani, Baljet and Raymond, coumarins, flavonoids, tannins, saponins and triterpenes. But results were negative for cardiotoxic glycosides using reagents Kedde and Liebermann-Burchard and triterpenoids using the reagent Salkowski, according to Table 2:

Table 2: Identification results of secondary metabolites of ethanol extract of the leaves of *M. guianensis*

Secondary metabolites	Extract ethanol	Colouring/Precipitation
Alkaloids		
Reagent the Mayer	Positive	Orange
Reagent the Wagner	Positive	Cream
Reagent the Dragendorff	Positive	Orange
Glycosides cardiotoxic		
Reagent the Salkowski	Positive	Red
Reagent the Kedde	Negative	Yellow
Reagent the Keller-Killiani	Positive	Dark green
Reagent the Liebermann	Negative	Yellow
Burchard		
Reagent the Baljet	Positive	Orange
Reagent the Raymond	Positive	Orange
Coumarins	Positive	Green fluorescence
Flavonoids	Positive	Red

Tannins	Positive	Green
Saponins	Positive	Foaming
Triterpenes		
Reagent the Liebermann-Burchard	Positive	Brown
Reagent the Salkowski	Negative	Red

For the secondary metabolites of the stems, the results were positive for: alkaloids, cardiotonic glycosides using Salkowski reagents, Keller-Killiani, Baljet and Raymond, coumarins, flavonoids, tannins, saponins and triterpenes. But results were negative for cardiotonic glycosides using reagents Kedde and Liebermann-Burchard, according to Table 3:

Table 3: Identification results of secondary metabolites of ethanol extract of the stems of *M. guianensis*

Secondary metabolites	Extract ethanol	Colouring/Precipitation
Alkaloids		
Reagent the Mayer	Positive	Orange
Reagent the Wagner	Positive	Purple
Reagent the Dragendorff	Positive	Orange
Glycosides cardiotonic		
Reagent the Salkowski	Positive	Red
Reagent the Kedde	Negative	Orange
Reagent the Keller-Killiani	Positive	Dark green
Reagent the Liebermann-Burchard	Negative	Yellow
Coumarins		
Reagent the Baljet	Positive	Orange
Reagent the Raymond	Positive	Orange
Flavonoids		
Reagent the Baljet	Positive	Green fluorescence
Tannins		
Reagent the Salkowski	Positive	Red
Reagent the Liebermann-Burchard	Negative	Yellow

Saponins	Positive	Foaming
Triterpenes		
Reagent the Liebermann-Burchard	Positive	Brown
Reagent the Salkowski	Positive	Orange

While for the secondary metabolites of bark, the results were positive for: alkaloids, cardiotonic glycosides using reagents and Salkowiski Baljet, coumarins, flavonoids, condensed tannins and triterpenes. But results were negative for cardiotonic glycosides using Kedde reagents, Keller-Killiani, Liebermann-Burchard and Raymond and saponins, according to Table 4:

Table 4: Identification results of secondary metabolites of ethanol extract of bark of *M. guianensis*

Secondary metabolites	Extract ethanol	Colouring/Precipitation
Alkaloids		
Reagent the Mayer	Positive	Orange
Reagent the Wagner	Positive	Purple
Reagent the Dragendorff	Positive	Orange
Glycosides cardiotonic		
Reagent the Salkowiski	Positive	Green
Reagent the Kedde	Negative	Orange
Reagent the Keller-Killiani	Negative	Yellow
Reagent the Liebermann Burchard	Negative	Yellow
Burchard		
Reagent the Baljet	Positive	Orange
Reagent the Raymond	Negative	Red
Coumarins	Negative	Not Green fluorescence
Flavonoids	Positive	Orange
Tannins	Positive	Green
Saponins	Negative	No foaming
Triterpenes		

Reagent the Liebermann-Buchard	Positive	Brown
Reagent the Salkowski	Positive	Red

Based on the results obtained, the qualitative phytochemical analysis indicated the presence of large number of classes of secondary metabolites present in the leaves, stems and bark of *M. guianensis*. Of secondary metabolites analyzed the substances that were found present alkaloids, coumarins, flavonoids and tannins using all specific reagents. The absence of other compounds may be associated with the degree of ripeness at harvest, by genetic differences between cultivars, storage conditions, time between harvesting and pulping and storage conditions of the pulp, among other factors, as expressed Schmidt (2009).

Still According Bobbio; Bobbio (2003), the degradation of some compounds may occur during the extraction of vegetable, processing and storage of food, influenced by extrinsic and intrinsic factors. Temporal and spatial variations in total content as well as the relative proportions of secondary metabolites in plants occur at different levels (seasonal and daily; intraplanta, inter- and intraspecific), and despite the existence of a genetic control, the expression may undergo modifications resulting from interaction of biochemical, physiological, ecological and evolutionary processes. They represent a chemical interface between the plant and the surrounding environment, so its synthesis is often affected by environmental conditions (COUTINHO, 2013).

The plant extracts containing alkaloids are used as medicines, poisons and magic portions since the dawn of civilization. Thus it is difficult to establish the correct origin of the discovery of these substances. Records indicate that opium was used by the Sumerians 4000 years BC because of its soporific and analgesic properties (HOSTETTMAN et al., 2003).

The isolation of the first pure substances from the plant kingdom begins to happen in the nineteenth century. This century characterized by extracting work mainly organic acids and organic bases which later received alkaloids denomination. Are this time the isolation of morphine (1804), quinine and strychnine (1820) (ALMEIDA et al., 2009).

Currently, numerous experiments show the fact that many secondary metabolites present in plants, such as terpenes, alkaloids, cyanogenic glycosides, saponins, tannins, anthraquinones are allelochemicals representing adaptive characters and has diversified during evolution by natural selection to protect plants against viruses, bacteria, fungi, plants and competing against herbivores (WINK, 2003).

Cardiac glycosides are complex triterpene molecules created by amphibians and plants that exert intense biological effects in humans and many other organisms. While extremely toxic, these molecules often have therapeutic use, when properly administered in minute quantities. In humans,

small amounts of cardiac glycosides soften and strengthen the heart beat. They do this by blocking the sodium and potassium pump of heart cells, which leads to a delay in the electrical signal between the atria and the ventricles. In larger amounts, cardiac glycosides can be extremely toxic, rapidly induce drowsiness, color vision disorders, slow and irregular heart rhythm, followed by death (SIMÕES et al., 2004).

The coumarin found in all botanical structures *M. guianensis* are a chemical class, the first isolated representative of Vogel in 1820, the species coumarone odorata. These metabolites are present in different parts of the plants both in the roots and in the flowers and fruits and may be distributed in different families of Angiospermae as Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae in which are found with wide occurrence. Also present in Fabaceae, Oleaceae, Moraceae and Thymeleaceae. Among the taxa that biosynthesize coumarins have species of very diverse habits, such as trees, shrubs and herbs (RIBEIRO; KAPLAN, 2002).

The plants rich in alkaloids pyrrolizidine began to be studied by chemists of natural products because farmers in many parts of the world, began to associate them with the intoxication of ruminants and horses, which caused serious economic problems (BULL et al., 1968).

Flavonoids also found in all botanical structures *M. guianensis* represent one of the major phenolic groups and diverse among the products of natural origin. This class of secondary metabolites is widely distributed in the plant kingdom (SIMÕES et al., 2004). They are found in fruits, vegetables, seeds, bark, roots, stems, flowers and their preparation products such as tea and wine (NIJVELDT et al., 2001). They have a characteristic core C₆-C₃-C₆ being biosynthesized from the channels of shikimic acid and acetic acid (CAZAROLLI et al., 2002).

Clinical studies have been conducted in various parts of the world in order to verify the effectiveness of flavonoids in diseases of inflammatory origin, such as interstitial lung disease, idiopathic pulmonary fibrosis, asthma and pulmonary sarcoidosis. In these studies highlight the flavonol quercetin. Moreover, efficacy studies involving synthetic derivatives are also being developed (HOWES et al., 2007).

The pentacyclic triterpenes and friedelânicos quinonamethide are the most common in plant extracts of *M. guianensis* (HURTADO, 2013). The reported biological structures and functions are: pentacyclic triterpenes: a skeleton is formed by three carbon atoms may be arranged in five six-membered rings (NUÑEZ et al., 2005). The populnônico acid, isolated from the bark of *Austroplenchia populnea*, has anti-inflammatory activity. This plant is found in the Brazilian Cerrado and used in folk medicine for the treatment of dysentery and inflammations such as rheumatism (ANDRADE et al., 2007); Sesquiterpenes: Basic skeleton dihydro- β -agarofurano. This structure comprises rings A and B as a decalin, having a melt tetrahydrofuranyl bridge. This isolated from *Celastrus vulcanicola* presents photosynthetic inhibition activity. The isolated constituents of this plant

and its biological activity had not yet been investigated. *C. vulcanicola* is a subtropical woody vine distributed in Central America and the Caribbean (TORRES-ROMERO et al., 2008); Quinonamethide triterpenes: secondary metabolites are restricted to higher plants of Celastraceae family (CORSINO et al., 2000). Tingenone is a substance isolated from the roots of several species of the family Celastraceae, for example, *Austroplenckia populnea* (DUARTE et al., 2006) and *Hippocratea excelsa* (MENA-REJÓN et al., 2007). Has numerous biological activities, such as *Trypanosoma cruzi* (DUARTE et al., 2006), intestinal *Giardia* (MENA-REJON et al., 2007) and inhibition of tubulin protein that may be the mode of action which justifies the cytotoxic and antitumor activity (MORITA et al., 2008).

Steroids or triterpenes constitute the essential or volatile oils. According Fracaro et al. (2004), there is no fundamental difference between the triterpenes and sterols, considering the latter as tetracyclic triterpenes have lost at least three methyls. These metabolites are found in the ethanol extracts of bark and stems of medicinal plants, because their therapeutic interest gives to the importance of cardiotonic glycosides, which are part of this group. Tannins have proved positive in this study, can be used to treat diarrhea, as diuretics in stomach problems (heartburn, gastritis, gastric ulcer, tumor stomach and duodenum) and also as anti-inflammatory, antiseptic and haemostatic (CUNHA et al., 2010).

The presence of saponins was confirmed in the study with only the leaves and bark, as to be busy, the plant extract formed foams, indicating a positive result. According Yang et al. (2010), the antifungal activity of saponins, is due to the interaction of these sterols with the plasma membrane

4 Conclusion

From the experiments, it was found that all botanical structures fitoquimicamente tested exhibit secondary metabolites (alkaloids, coumarins, flavonoids, tannins and triterpenes). However, it is necessary that this species is subject to phytochemicals biomonitorados studies, in order to isolate and identify the active compounds and establish relationship with the biological activities observed in popular use.

Acknowledgements

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for financial support and the Research Support Foundation of Amazonas State (FAPEAM) for granting the scholarship for the first author.

References

ALHO, C.J.R. Importância da biodiversidade para a saúde humana: uma perspectiva ecológica. **Estudos avançados**, v.26, n.74, p.156-164, 2012.

ALMEIDA, M.R.; LIMA, J.A.; SANTOS, N.P.; PINTO, A.C. Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.4, p.54-60, 2009.

ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.V.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.464-471, 2007.

ANDRADE, J.I.A. **Atividade antibacteriana dos extratos dos frutos de *Coussapoa asperifolia magnifolia* (Trécul) contra *Aeromonas hydrophila* e fracionamento do extrato metanólico**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual do Amazonas, Manaus.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à Química dos Alimentos**. 3ed. São Paulo: Varela, 2003.

BORRÁS, M.R.L. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas – Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa**. Manaus: Valer, 2003. 322p.

BULL, L.B.; CULVENOR, C.C.; DICK, A.J. **The Pyrrolizidine Alkaloids: Their Chemistry, Pathogenicity and Other Biological Properties**. Amsterdam: North-Holland, 1968.

CAZAROLLI, L.H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E.H.; FIGUEIREDO, M.S.R.B. Mini-Revisão sobre metabólitos secundários. **Medicinal Chemical**, v.8, n.1, p.1429, 2002.

CORSINO, J.; CARVALHO, P.R.F.; KATO, M.J.; LATORRE, L.R.; OLIVEIRA, O.M.M.F.; ARAÚJO, A.R.; BOLZANI, V.S.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v.55, p.741-748, 2000.

COUTINHO, M.R. **Extração de tanino em folhas, sementes e frutos verdes de cinamomo (*Melia azedarach* L.) com diferentes tipos de solventes**. 2013. 42f. Trabalho de conclusão de curso de

graduação: Tecnologia em Alimentos da Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. 42f.

CUNHA, A.P.; SALGUEIRO, L.; ROQUE, O.R. **Metilxantinas**. In: CUNHA, A. P. (Org). Farmacognosia e Fitoquímica. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010.

DAS, B. K.; SAHU, S.; PRADHAN, J.; MOHAPATRA, B.C.; MISHRA, B.K.; SARANGI, N. Effect of *Magnifera indica* kernel as a feed additive on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in Labeo rohita fingerlings. **Fish & Shellfish Immunology**, v.23, p.109-118, 2007.

DUARTE, L.P.; VIEIRA-FILHO, S.A.; SILVA, G.D.F.; SOUSA, J.R.; PINTO, A.S. Anti-trypanosomal activity of pentacyclic triterpenes isolated from *Austroplenckia populnea* (Celastraceae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.44, n.1, p.109-112, 2006.

DUKE, J.A.; VÁSQUEZ, R. **Amazonian ethnobotanical dictionary**. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1994. 114p.

FONSECA, A.P.N.D.; SILVA, G.D.F.; CARVALHO, J.J.; SALAZAR, G.D.C.M.; DUARTE, L.P.; SILVA, R.P.; TAGLIATI, C.A.; ZANI, C.L.; NEVES, T.M.A.; PERES, V.; VIEIRA-FILHO, S.A. (2007). Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. **Química Nova**, v.30, n.4, p.842-847.

FRACARO, S.N.; DECONTO, I.; NAKASHIMA, T. **Potencial de toxicidade reprodutiva do extrato de *Tillandsia usneoides* Linnaeus, 1762 (barba-de-pau) em coelhas gestantes**. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004, 60p.

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

HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar. 2003.

HOWES, L.G.; JAMES, M.J.; FLORIN, T.; WALKER, C. Expert Opin. **Invest. Drugs** v.16, n.1, p.1255, 2007.

HURTADO, F.B. **Contribuição ao estudo fitoquímico e biológico da entrecasca da espécie *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek**. 2013. 170 f. Doutorado em Biologia Experimental. Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho.

MACARI, P.A.T.; PORTELA, C.N.; POHLIT, A.M. Antioxidant, cytotoxic and UVB-absorbing activity of *Maytenus guianensis* Klotzsch (Celastraceae) bark extracts. **Acta Amazônica**, v.36, n.4, p.513-518, 2006.

MATOS, F.J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3.ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009. 141p.

MENA-REJÓN, G.J.; PÉREZ-ESPADAS, A.R.; MOO-PUC, R.E.; CEDILLO-RIVERA, R.; BAZZOCCHI, I.L.; JIMÉNEZ-DIAZ, I.A.; QUIJANO, L. Antigiardial activity of triterpenoids from root bark of *Hippocratea excelsa*. **Journal of Natural Products**, v.70, p.863-865, 2007.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.316-320, 2005.

MORITA, H.; HIRASAWA, Y.; MUTO, A.; YOSHIDA, T.; SEKITAB, S.; SHIROTAB, O. Antimitotic quinoid triterpenes from *Maytenus chuchuhuasca*. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v.18, p.1050-1052, 2008.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.; HOORN, D.E.C.; BOELEN, P.G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.74, n.1, p.418, 2001.

NUÑEZ, M.J.; REYES, C.P.; JIMÉNEZ, I.A.; MOUJIR, L.; BAZZOCCHI, I.L. Lupane triterpenoids from *Maytenus* species. **Journal of Natural Products**, v.68, n.7, p.1018-1021, 2005.

OLIVEIRA, D.M.; SILVA, G.D.F.; DUARTE, L.P.; VIEIRA, S.A. Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acantophylla* Reissek, Celastraceae. **Biochemical Systemy Ecology**, v.34, p.661-665, 2006.

REVILLA, J. **Apontamentos para a cosmética Amazônica**. SEBRAE-INPA, Manaus, Amazonas, 2002. 445p.

RIBEIRO, C.V.C.; KAPLAN, M.A.C. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em Angiospermae. **Química Nova**, v.25, n.4, p.533-538, 2002.

SCHIMIDT, D. **Palmeira Juçara**: exploração ecológica dos frutos. Agroecologia e Saúde, 2009.

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. Editora da UFSC: Santa Catarina, 2004.

TANAKA, J.C.A.; SILVA, C.C.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V.; CARVALHO, J.E.; FOGLIO, M.A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v.28, n.5, p.834-837, 2005.

TORRES-ROMERO, D.; KING-DIAZ, B.; JIMÉNEZ, I.A.; LOTINA-HENNSEN, B.; BAZZOCCHI, I.L. Sesquiterpenes from *Celastrus vulcanicola* as photosynthetic inhibitors. **Journal of Natural Products**, v.71, p.1331-1335, 2008.

YANG, C. R. et al. Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. 50 (5). p. 1710-1714, 2006.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from anecological and molecular phylo genetic perspective. **Phytochemistry**, v.64, n.1, p.3-19, 2003.

ZILBERG, D.; ABUTBUL, S.; GOLAN-GOLDHIRSH, A.; BARAZANI, O. Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). **Aquaculture**, v.238, p.97-105, 2004.

EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK (CELASTRACEAE) SOBRE *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINE, 1887)

Renato Abreu Lima¹, Andrina Guimarães Silva Braga^{1,2}, Caroline Oliveira Celestino², Fábio da Silva Barbieri², Luciana Gatto Brito² & Valdir Alves Facundo¹

¹Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais, Fundação Universidade Federal de Rondônia; ²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA RONDÔNIA. renatoabreu07@hotmail.com

Maytenus guianensis é uma planta da Amazônia brasileira muito utilizada na medicina popular contra malária e leishmaniose. *Rhipicephalus microplus* é um importante ectoparasita que causa prejuízos econômicos à pecuária brasileira. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade carrapaticida do extrato etanólico das cascas de *M. guianensis* sobre *R. microplus*. As cascas foram coletadas, posteriormente, secas, trituradas e submetidas à extração em aparelho de Soxhlet com diferentes solventes de acordo com grau de polaridade. Fêmeas ingurgitadas foram coletadas de bovinos no Campo Experimental da Embrapa Rondônia. As fêmeas foram encaminhadas para o Laboratório de Sanidade Animal, imersas em solução de hipoclorito de sódio 2%, enxutas em papel toalha e selecionadas conforme a integridade, motilidade e grau de ingurgitamento. Dessas, apenas 30 foram separadas para a postura. As larvas utilizadas no Larval Packet Test foram obtidas de um grupo de 30 fêmeas ingurgitadas, anteriormente selecionadas, as quais foram fixadas dorsalmente em placas de Petri e acondicionadas em estufa tipo BOD ($\pm 27^{\circ}\text{C}$ e UR > 80%) para realização da postura. Após 18 dias de ovoposição, as posturas foram retiradas e acondicionadas em tubos plásticos arrolhados com algodão hidrófilo e mantidas em BOD até a eclosão das larvas. Os envelopes foram confeccionados em papel filtro e impregnados com o extrato etanólico das cascas de *M. guianensis* diluídos em etanol, em triplicata utilizando as seguintes concentrações: 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL. Foram preparados ainda envelopes impregnados com etanol (controle negativo) e cipermetrina em grau técnico na concentração de concentração de 25,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (controle positivo). Aproximadamente 100 larvas foram colocadas em cada envelope, vedados imediatamente e acondicionados em BOD por 24 horas. Após este período os envelopes foram abertos, e realizados a contagem de larvas utilizando o cálculo da porcentagem de mortalidade. A concentração letal foi calculada através do teste estatístico Probit. Verificou-se que o extrato etanólico das cascas de *M. guianensis* não apresentou atividade carrapaticida, notando-se que a maior porcentagem de mortalidade foi 28% utilizando-se a máxima concentração que foi de 50 mg/mL. Contudo, se faz necessário a realização de novas metodologias para verificar a menor concentração para a mortalidade de *R. microplus*. (FAPEAM, CNPq)

Keywords: Celastraceae, Triterpenos, Carrapaticida.

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DE *Maytenus guianensis* KLOTZSCH EX REISSEK (CELASTRACEAE) SOBRE *Candida albicans*

Renato Abreu Lima¹, Fernanda Bay-Hurtado¹, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti², Júlio Sancho Linhares Teixeira Militão¹ & Valdir Alves Facundo¹

¹Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais, Universidade Federal de Rondônia; ²Colégio de Aplicação, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre; ³Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM), Porto Velho, Rondônia. renatoabreu07@hotmail.com

Maytenus guianensis Klotzsch Ex Reissek, conhecida popularmente como chichuá, é uma árvore de pequeno porte endêmica de terra firme na Amazônia. Suas raízes e caules são utilizados na medicina tradicional como analgésico, anti-inflamatório, afrodisíaco, relaxante muscular, antireumático e antidiarreico. *Candida albicans* é o patógeno mais comum nas candidíases cutâneas e da orofaringe, porém as espécies não *albicans* têm aumentado em número e em importância nas candidíases vaginal e sistêmica. Devido à ocorrência de fatores indesejáveis, como o surgimento de resistência de algumas cepas aos antifúngicos convencionais principalmente em indivíduos imunodeprimidos e a presença de efeitos tóxicos destes, o estudo de plantas com propriedades terapêuticas se faz necessário. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade fungicida do extrato etanólico das cascas de *M. guianensis* sobre *C. albicans in vitro*. As cascas coletadas foram devidamente secas e trituradas, sendo submetidas à extração em aparelho de Soxhlet com etanol p.a., sendo posteriormente diluídas com DMSO a 2% e para avaliar o potencial biológico sobre o fungo, utilizou-se à técnica de difusão em ágar em poços na concentração de 1mg.mL⁻¹, concentração esta já definida pela técnica de Menor Concentração Inibitória (MIC) realizada. Leveduras de *C. albicans* foram cultivadas em meio BDA durante 24 horas com a absorvância de turvação. Para o controle negativo, utilizou-se somente o meio BDA; controle positivo foi realizado com emulsificante Kasumin[®]. O delineamento foi inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. A avaliação consistiu em verificar os halos de inibição de crescimento fúngico, a cada 24 horas, durante cinco dias. Observou-se, que após 120 horas, o extrato etanólico das cascas de *M. guianensis* apresentou resultados dos halos de inibição sobre *C. albicans*, na qual os halos de inibição de crescimento foram de 1,52 mm do extrato etanólico, demonstrando maior espectro inibitório, se comparado com o controle negativo que foi de 2,87 mm, enquanto que no controle positivo o halo de inibição foi de 2,11 mm. Os resultados sinalizam o potencial antimicrobiano dessa planta, podendo ser promissoras para estudos de desenvolvimento de novos fármacos. (FAPEAM, CNPq)

Keywords: Celastraceae, Triterpenos, Fitoquímica.