



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

PATRÍCIA MARIA DA SILVA NERI

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Maytenus rigida* MART. (BOM-NOME): PLANEJAMENTO FATORIAL E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

RECIFE / 2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

PATRÍCIA MARIA DA SILVA NERI

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Maytenus rigida* MART. (BOM-NOME): PLANEJAMENTO FATORIAL E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Prof^a. Dr^a. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Orientadora)
Dr. Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho (Co-Orientador)

RECIFE / 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

N445e Neri, Patrícia Maria da Silva.
Extração de compostos fenólicos de *Maytenus rigida* mart. (bom-
nome): planejamento fatorial e atividade antimicrobiana / Patrícia Maria
da Silva Neri. – 2016.
71 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife,
2016.
Inclui referências.

1. Polifenóis. 2. Análise multivariada. 3. Extratos vegetais. I. Amorim,
Elba Lúcia Cavalcanti de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-199)

PATRÍCIA MARIA DA SILVA NERI

“EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Maytenus rigida* MART. (BOM NOME): PLANEJAMENTO FATORIAL E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 29/02/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Luis Alberto Lira Soares (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Antônio de Souza Araújo (Examinador Externo)
Universidade Federal do Tocantins

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISAS E PÓS-GRADUAÇÃO

Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Almir Gonçalves Wanderley

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Rafael Matos Ximenes

Este trabalho é dedicado à ***Dilma Neri*** e
Rosembergue Neri, por serem meu porto
seguro e me apoiarem em todos os
momentos. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todo amparo, força e proteção durante toda a minha vida, sem Ele nada seria.

Aos meus pais, *Dilma e Rosembergue*, pelo apoio nos momentos difíceis, cuidado, carinho e amor. Essa conquista também é de vocês!

À minha família, em especial meu irmão *Sávio* e minhas avós *Elizabete* e *Eliezer*, pelo carinho e atenção, além dos domingos de distração e dos mimos deliciosos; e aos meus irmãos de coração, *Daniel Brandão* e *Daniella Lima*, por todo incentivo, apoio e amizade.

À minha orientadora, *Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti*, pelo apoio, amizade e conhecimentos compartilhados desde a Iniciação Científica. Obrigada pela confiança depositada em mim!

Ao meu co-orientador, *Tadeu Peixoto*, pela amizade e aprendizado.

Aos meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT), *Valérium Castro*, *Jenifer Rodrigues*, *Bruno Andrade*, *Allan Chernichiarro*, *Elvis Alves*, *Thiago Araújo*, *Emanuelly Araújo*, *Ana Klarissa*, *Lucas Danda*, *Aline Cheron* e *Jessica Carolina*, por todo apoio e disponibilidade.

Aos meus amigos companheiros de mestrado, *Rebeka Monteiro*, *Hyalynne Santos* e *Marcos Galvão*, por todos os momentos compartilhados.

Às minhas farmacêuticas lindas, *Hellencléia Cunha*, *Aline Fernanda*, *Misne Gomes* e *Camila Jéssica*, pela amizade e carinho.

Às minhas amoras, *Altamires Santos*, *Cássia Cruz* e *Magda Tavares*, por estarem sempre dispostas a me ouvir e ajudar.

Ao meu grupo “3 doutores e 1 biólogo”, *Nelson Lima*, *Everton Melo* e *Debora Santana*; e aos meus amigos *Iago Delano* e *Thiago David*.

Ao Laboratório de Fármacos: Ensaios Antimicrobianos, em especial a *Profa. Késia Xisto*, pela atenção, disponibilidade e apoio na realização da atividade antimicrobiana.

Ao Laboratório de Farmacognosia, pela disponibilidade dos equipamentos.

À *Alexandre*, *Isaque* e toda Comunidade do Carão, pelo auxílio na coleta das amostras vegetais.

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao Programa de Ciências Farmacêuticas e todas as pessoas que o compõem.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta nessa conquista, meus sinceros agradecimentos!

**“Em tudo dai graças”
(1 Ts 5, 18)**

RESUMO

Os compostos fenólicos são um grupo de substâncias facilmente encontradas na natureza, presentes em várias espécies vegetais. A forma de retirada e obtenção destes compostos presentes nas matrizes das células vegetais é através dos métodos extrativos. A extração é a primeira etapa dos estudos com plantas e pode sofrer interferência de vários fatores como temperatura, tempo de extração, solvente e parte da planta utilizada e tem se tornado um dos principais alvos nos estudos com planejamento fatorial. *Maytenus rigida* Mart., espécie considerada nativa do nordeste brasileiro, é rica em compostos fenólicos e apresenta atividades farmacológicas conhecidas, entre elas a atividade antimicrobiana. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo analisar as condições extrativas de compostos fenólicos de cascas e folhas desta espécie através de ensaios fitoquímicos e microbiológicos. As amostras foram submetidas à extração hidroetanólica (70%) através de cinco métodos extrativos: maceração, decocção sob refluxo, turbólise, ultrassom e micro-ondas, dos quais um foi escolhido para realização do planejamento fatorial. Esta escolha baseou-se nos doseamentos de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas; e nos ensaios antimicrobianos por testes de difusão em disco. Após determinação do método a ser utilizado, foi feito um planejamento fatorial 2^3 , para analisar a interferência do teor alcóolico, do tempo de extração e da proporção massa/solvente nos teores dos metabólitos analisados. O método por decocção sob refluxo foi o escolhido por ter se mostrado mais vantajoso na extração de compostos fenólicos, não havendo diferença significativa entre os métodos para a atividade antimicrobiana. No planejamento fatorial, as variáveis analisadas não exerceram influência sobre os teores de fenóis totais e taninos, já para flavonoides e cumarinas observou-se que o aumento da proporção de etanol aumentou a extração destes metabólitos. Para atividade antimicrobiana, as variáveis exerceram influência significativa frente a *M. luteus*. Os extratos também foram testados frente a cepas de *S. aureus* isolados clínicos, apresentando halos entre 12-15 mm, sendo considerados ativos.

Palavras-chave: Métodos extrativos. Polifenóis. Análise multivariada.

ABSTRACT

Phenolic compounds are a group of substances easily found in nature, present in several plant species. The form of withdrawal and obtaining these compounds in matrices of plant cells is through extractive methods. Extraction is the first stage of studies with plants and can be interfered with by many factors such as temperature, extraction time, solvent and part of the plant used and has become a major target in studies with factorial design. *Maytenus rigida* Mart., considered native to northeastern Brazil, is rich in phenolic compounds and has known pharmacological activities, including antimicrobial activity. Thus, this study aims to analyze the conditions extraction of phenolic compounds from barks and leaves of this specie through phytochemical and microbiological tests. The samples were submitted to extraction hydroethanol (70%) through five extractive methods: maceration, decoction under reflux, turbo-extraction, ultrasound and microwave, one of which was chosen to perform the factorial design. This choice was based on measurements of total phenols, tannins, flavonoids and coumarins; and antimicrobial tests for disk diffusion test. After determining the method to be used a factorial design 2^3 was done to analyze the interference of the alcoholic contents, the extraction time and the ratio mass/ solvent in the levels metabolites analyzed. The method by decoction under reflux was chosen for having been more advantageous in extracting of phenolic compounds, with no significant difference between methods for antimicrobial activity. In the factorial design, the analyzed variables did not influence on the contents of total phenols and tannins, flavonoids and coumarins have to be observed that the increase in the proportion of ethanol increased the extraction of these metabolites. To antimicrobial activity, the variables exercised significant influence against *M. luteus*. The extracts were also tested strains of *S. aureus* clinical isolates, showing halos between 12-15 mm, and are considered assets.

Keywords: Extractive methods. Polyphenols. Multivariate analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do tanino hidrolisável (a) e condensado (b).	19
Figura 2 - Núcleo fundamental dos flavonoides.	20
Figura 3 – Estrutura básica da cumarina.	21
Figura 4 - Esquema do processo de extração por decocção com refluxo.	23
Figura 5 - Indivíduo adulto de <i>Maytenus rigida</i> Mart.	26
Figura 6 - Coleta das amostras de <i>Maytenus rigida</i> na Comunidade do Carão, Altinho-PE.	34
Figura 7 - Placa cromatográfica para presença de Compostos Fenólicos nos extratos de cascas e folhas de <i>Maytenus rigida</i> .	41
Figura 8 – Placa cromatográfica para presença de Taninos Condensados nos extratos de cascas e folhas de <i>Maytenus rigida</i> .	42
Figura 9 – Placa cromatográfica para presença de Cumarinas nos extratos de cascas e folhas de <i>Maytenus rigida</i> .	42
Figura 10 - Placa de atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de <i>Maytenus rigida</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	45
Figura 11 - Diagramas de Pareto dos efeitos padronizados na extração das folhas de <i>Maytenus rigida</i> a partir do planejamento fatorial 2 ³ .	50
Figura 12 - Diagramas de Pareto dos efeitos padronizados na extração das cascas de <i>Maytenus rigida</i> a partir do planejamento fatorial 2 ³ .	51
Figura 13 – Gráfico de Superfície de Resposta dos teores de flavonoides dos extratos de folhas de <i>Maytenus rigida</i> obtidos pelo planejamento fatorial 2 ³ .	52
Figura 14 – Gráfico de Superfície de Resposta dos teores de cumarinas dos extratos de folhas de <i>Maytenus rigida</i> obtidos pelo planejamento fatorial 2 ³ .	53
Figura 15 – Gráficos de Superfície de Resposta dos teores de flavonoides dos extratos de cascas de <i>Maytenus rigida</i> obtidos pelo planejamento fatorial 2 ³ .	54
Figura 16 – Gráficos de Superfície de Resposta dos teores de fenóis totais dos extratos de cascas de <i>Maytenus rigida</i> obtidos pelo planejamento fatorial 2 ³ .	55
Figura 17 - Diagramas de Pareto dos efeitos padronizados na atividade antimicrobiana dos extratos das folhas de <i>Maytenus rigida</i> a partir do planejamento fatorial 2 ³ .	58
Figura 18 - Diagramas de Pareto dos efeitos padronizados na atividade antimicrobiana dos extratos das cascas de <i>Maytenus rigida</i> a partir do planejamento fatorial 2 ³ .	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistemas de eluição, padrões e reveladores utilizados para evidenciar a presença dos compostos fenólicos.	35
Tabela 2 – Níveis das variáveis do planejamento 2^3 para os extratos de cascas.	39
Tabela 3 – Níveis das variáveis do planejamento 2^3 para os extratos de folhas.	39
Tabela 4 – Análise química dos extratos de cascas e folhas de <i>Maytenus rigida</i> Mart. obtidos por cinco diferentes métodos extrativos.	41
Tabela 5 - Teores (mg/g) de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas, expressos em média $\pm$ desvio padrão, dos extratos obtidos a partir das folhas de <i>Maytenus rigida</i> Mart. por diferentes métodos extrativos.	43
Tabela 6 - Teores (mg/g) de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas, expressos em média $\pm$ desvio padrão, dos extratos obtidos a partir das cascas de <i>Maytenus rigida</i> Mart. por diferentes métodos extrativos.	43
Tabela 7 – Atividade antimicrobiana (halos de inibição em mm $\pm$ desvio padrão) dos extratos hidroalcoólicos de cascas e folhas de <i>Maytenus rigida</i> obtidos por 5 métodos extrativos diferentes.	46
Tabela 8 - Teores (mg/g) de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas expressos em média $\pm$ desvio padrão dos extratos das folhas de <i>Maytenus rigida</i> obtidos a partir dos ensaios de planejamento fatorial.	48
Tabela 9 - Teores (mg/g) de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas expressos em média $\pm$ desvio padrão dos extratos das cascas de <i>Maytenus rigida</i> obtidos a partir dos ensaios de planejamento fatorial.	48
Tabela 10 – Análise de variância para o modelo quadrático de superfície de resposta obtido a partir do planejamento fatorial 2^3 para os extratos de folhas de <i>Maytenus rigida</i> .	52
Tabela 11 – Análise de variância para o modelo quadrático de superfície de resposta obtido a partir do planejamento fatorial 2^3 para os extratos de cascas de <i>Maytenus rigida</i> .	53
Tabela 12 - Atividade antimicrobiana (halos de inibição em mm $\pm$ desvio padrão) dos extratos hidroalcoólicos de folhas de <i>Maytenus rigida</i> obtidos a partir do planejamento fatorial 2^3 .	56
Tabela 13 - Atividade antimicrobiana (halos de inibição em mm $\pm$ desvio padrão) dos extratos hidroalcoólicos de cascas de <i>Maytenus rigida</i> obtidos a partir do planejamento fatorial 2^3 .	56
Tabela 14 - Atividade antimicrobiana (halos de inibição em mm $\pm$ desvio padrão) dos extratos hidroalcoólicos de folhas de bom-nome frente a isolados clínicos de <i>S. aureus</i> .	61

Tabela 15 - Atividade antimicrobiana (halos de inibição em mm $\pm$ desvio padrão) dos extratos hidroalcoólicos de cascas de bom-nome frente a isolados clínicos de *S. aureus*. 61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1. Compostos fenólicos	18
2.2. Métodos extrativos	21
2.3. Planejamento Fatorial	24
2.4. Maytenus - aspectos botânicos, fitoquímicos e farmacológicos	26
2.5. Atividade antimicrobiana e metabólitos secundários	28
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Coleta do material vegetal	34
4.2. Preparação dos extratos	34
4.3. Análises fitoquímicas	35
4.4. Atividade antimicrobiana	37
4.5. Planejamento Fatorial	38
4.6 Análise Estatística	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Fitoquímica	41
5.2. Atividade antimicrobiana	44
5.3 Planejamento Fatorial	47
5.4. Atividade antimicrobiana frente a isolados clínicos	60
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas pela medicina popular há muito tempo com a finalidade de tratamento e prevenção de diversas doenças, tornando-se um recurso terapêutico importante para grande parte da população (REINALDO et al., 2015). Desta forma, produtos naturais, especialmente os originados a partir de plantas, continuam sendo excelentes fontes de moléculas bioativas. Apresentam uma diversidade biológica que está relacionada à variabilidade química, ou seja, os organismos estão sujeitos a interações metabólicas e ambientais, produzindo sempre novas moléculas (MOLINARI, 2009).

A atividade farmacológica está relacionada aos metabólitos secundários produzidos pelas plantas, os quais podem ser de diversas classes como alcaloides, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, quinonas, taninos, saponinas e terpenos (CARDOSO et al., 2010).

Os compostos fenólicos são um grupo de substâncias facilmente encontradas na natureza, presentes em várias espécies vegetais (SVOBODOVÁ et. al., 2003; SILVA et. al., 2010). Neste grupo encontram-se os flavonoides, taninos, cumarinas e outros ácidos fenólicos que são essenciais para o desenvolvimento das plantas, agindo principalmente na proteção dos estresses causados pelo ambiente, como insetos, infecções, radiações UV, entre outros (ANGELO; JORGE, 2006). São metabólitos com crescente interesse farmacológico, entre as atividades atribuídas a eles destacam-se anti-inflamatória, antioxidante e antibacteriana (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004).

A forma de retirada e obtenção destes compostos presentes nas matrizes das células vegetais é através dos métodos extrativos. A extração é a primeira etapa dos estudos com plantas medicinais, sendo de extrema importância nos resultados obtidos, pois interfere nos testes qualitativos e quantitativos dos metabólitos, exercendo papel fundamental no resultado final do processamento de produtos farmacêuticos e alimentícios (AZMIR et al., 2013). Esta etapa pode sofrer interferência de vários fatores como temperatura, tempo de extração, solvente e parte da planta utilizada (AZMIR et al., 2013).

Devido a relevância desta etapa, os processos extrativos são os principais alvos nos estudos com planejamento fatorial, pois com o mínimo de testes é possível avaliar e otimizar as condições de extração, considerando as variáveis críticas e evidenciando as interações entre os fatores que influenciam o processo (SOUZA et al., 2009).

Os extratos de espécies do gênero *Maytenus* (Celestraceae) apresentam vários compostos fenólicos, além disso, possuem atividades farmacológicas com amplo uso na medicina popular e algumas confirmadas em testes laboratoriais como antimicrobiano

(ESTEVAM et al., 2009), analgésico (DIAS et al., 2007), cicatrizante (LIMA et al., 2010) e anti-inflamatório (MENDES et al., 2012).

Maytenus rigida é uma espécie vegetal endêmica da região de Caatinga e apresenta em sua composição vários compostos fenólicos (ROCHA et al., 2004; SANTOS et al., 2011), sendo esta amplamente utilizada pela medicina popular nordestina. Por ser do mesmo gênero da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), espera-se que esta espécie apresente atividades farmacológicas semelhantes, tornando o estudo da mesma relevante por apresentar novas alternativas de tratamento para diversas enfermidades.

Entre as atividades farmacológicas atribuídas a *Maytenus rigida* encontra-se a atividade antimicrobiana, que vêm ganhando destaque devido ao surgimento do fenômeno conhecido como resistência bacteriana, ocasionado pelo uso indiscriminado de antibióticos, sendo considerado um grande problema de saúde e principal motivo do insucesso dos tratamentos (SILVA et al., 2010).

Desta forma, as plantas se tornaram alvo interessante na busca de solução para este problema, pois alguns extratos já possuem atividade antimicrobiana conhecida, além de apresentar propriedade modulatória, modificando a resistência de alguns compostos sintéticos (COUTINHO et al., 2012).

Diante disto, o presente trabalho tem por objetivo analisar a influência das condições extrativas sobre os teores de compostos fenólicos das cascas e folhas de *Maytenus rigida* Mart. em extratos hidroalcoólicos. As extrações serão acompanhadas de análises fitoquímicas e microbiológicas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Compostos fenólicos

As plantas são capazes de produzir metabólitos em situações de estresse, que são de extrema importância para o crescimento e reprodução, entre eles estão os compostos fenólicos. Estes apresentam uma estrutura química de anéis aromáticos e hidroxilas substituídas, atuando nos vegetais como agente antipatogênico e contribuindo na pigmentação (ANGELO; JORGE, 2006).

Esses metabólitos formam um grupo de compostos diversificados quimicamente, derivados da tirosina e fenilalanina, onde encontram-se os flavonoides, taninos, cumarinas, lignanas e vários outros metabólitos secundários (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Os taninos são substâncias solúveis em água de peso molecular relativamente alto e possuem a capacidade de formar complexos insolúveis em água com alcaloides e proteínas (FONSECA; LIBRANDI, 2008). O termo “tanino” foi empregado inicialmente para designar substâncias de origem vegetal utilizadas no processamento do couro, com o passar do tempo, aumentaram os estudos a respeito dessas substâncias e descobriram as diversas funcionalidades (ARAPTISAS, 2012).

São compostos encontrados em várias partes das plantas, como folhas, cascas, raízes e sementes, onde a concentração sofre variação de acordo com a parte coletada, bem como em função da idade e tamanho da planta (BATTESTIN et al., 2004; MONTEIRO et al., 2005). Nos vegetais, os taninos apresentam a função de inibir os herbívoros e em combinação com proteínas, torna os tecidos vegetais resistentes à putrefação (MONTEIRO et al., 2005).

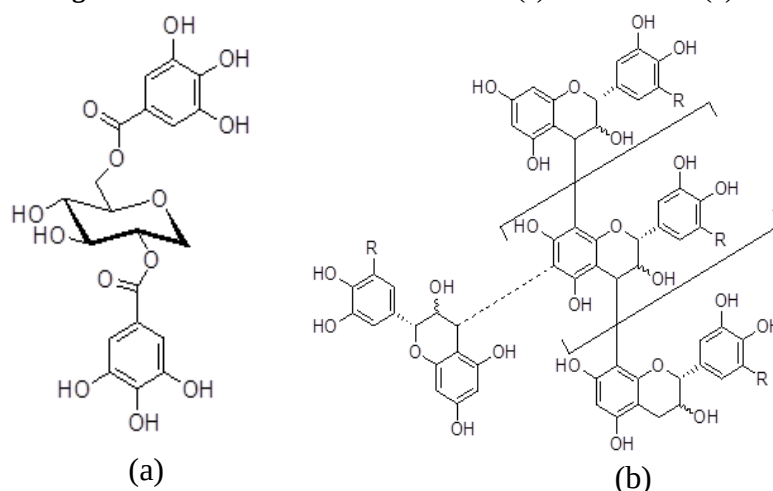
Entre as ações farmacológicas, encontra-se o efeito hemostático, e como precipitam alcaloides, podem servir de antídoto em casos de intoxicações (SANTOS; MELLO, 2004; MONTEIRO et al., 2005). Auxiliam no processo de cura de feridas, queimaduras e inflamações através da formação de uma camada protetora sobre a pele ou mucosa danificada, ocorrendo, abaixo desta, o processo natural de cura. Devido à propriedade de precipitação das proteínas, também possuem efeitos antibacteriano e antifúngico (SANTOS; MELLO, 2004; MONTEIRO et al., 2005).

A partir da estrutura química, os taninos dividem-se em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. São ésteres de ácido gálico e ácido elágico glicosilados, sintetizados a partir do chiquimato. Já os taninos condensados são provenientes do metabolismo do fenilpropanol,

amplamente encontrados no reino vegetal (MONTEIRO et al., 2005). Na figura 1 podem ser visualizadas as estruturas químicas dos dois grupos de taninos.

Para o doseamento de taninos, os métodos podem ser baseados na propriedade de precipitar proteínas, na capacidade de complexação com metais ou a combinação dos dois (MONDAL et al., 2001). Os métodos colorimétricos são os mais comumente utilizados por serem mais baratos e sensíveis. Podem reagir com grupos fenólicos gerais ou com um grupo funcional específico, devido a uma estrutura em particular dos taninos (GIUSTI; WROSLTAD, 2000).

Figura 1 – Estrutura do tanino hidrolisável (a) e condensado (b).



Fonte: SBFgnosia (2015)

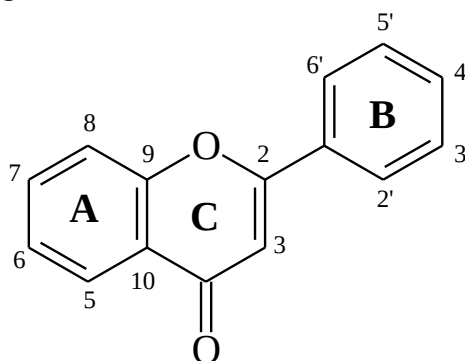
Entre estes métodos colorimétricos encontra-se o de Folin-Ciocalteu, que é amplamente utilizado e quantifica fenóis totais baseando-se na oxirredução entre os compostos fenólicos e os íons metálicos (SINGLETON et al., 1999). Já o método de vanilina clorídrica detecta grupos funcionais específicos dos taninos (MONTEIRO et al., 2005), a partir da formação do radical vanilina em meio ácido e é utilizado para doseamento de taninos condensados (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Os flavonoides são compostos fenólicos produzidos no citosol e vacúolos dos vegetais. São moléculas de baixo peso molecular e apresentam potente ação antioxidante, inibindo a peroxidação dos lipídeos e reduzindo o dano celular causado pelo estresse oxidativo (ALINIAN; RAZMJOO; ZEINALI, 2016).

Estes compostos são derivados da via dos fenilpropanoides com diversas formas estruturais, porém a maioria apresenta um núcleo principal com 15 carbonos, formado por duas fenilas ligadas por uma cadeia de 3 carbonos. Nos compostos tricíclicos (Figura 2), as unidades da estrutura fundamental são chamadas de núcleos A, B e C (ZUANAZZI; MONTANHA,

2004). Os flavonoides são amplamente distribuídos nos vegetais podendo ser encontrados nas folhas, flores, caule e ramos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004; YAO et al., 2004). Em sua maioria, são compostos coloridos, normalmente amarelos, ocorrem na forma livre ou ligados a açúcares (YAO et al., 2004; BEHLING et al., 2008). Apresentam mais de 5000 compostos identificados e podem ser divididos em 13 classes diferentes (BEHLING et al., 2008).

Figura 2 – Núcleo fundamental dos flavonoides.



Fonte: Autor.

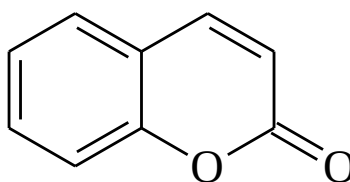
Entre as funções que exercem nos vegetais, destacam-se a proteção contra incidência de raios ultravioleta e visível, ação antioxidante, inibição de enzimas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004), além de atuarem na atração de insetos para polinização (YAO et al., 2004).

Algumas atividades farmacológicas são atribuídas a estes metabólitos, como antitumoral, antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

Para quantificação destes metabólitos destacam os métodos espectrofotométricos devido a rapidez e baixo custo. O método colorimétrico com cloreto de alumínio é o mais utilizado, pois o cátion Al^{3+} forma complexo com as hidroxilas livres dos flavonoides, levando a um prolongamento do sistema conjugado e consequente deslocamento dos picos de absorbância, evitando a sobreposição de bandas causada pelos outros métodos (MARQUES et al., 2012).

Outros metabólitos que também fazem parte do grupo dos compostos fenólicos são as cumarinas. São derivadas do metabolismo da fenilalanina, onde o representante mais simples é a cumarina (1,2 – benzopirona), nome derivado da planta *cumaru*, estrutura representada na figura 3. Podem ser encontradas nas diferentes partes da planta e apresentam uma importância farmacológica comprovada (KUSTER; ROCHA, 2004).

Figura 3 – Estrutura básica da cumarina.



Fonte: Autor.

As cumarinas são abundantes em muitas espécies vegetais e entre as várias atividades farmacológicas que podem ser conferidas a esta classe de compostos, podemos citar ação antimicrobiana, antioxidante, anticoagulante e anti-inflamatória (SKALICKA-WOŹNIAK et al., 2016).

2.2. Métodos extrativos

A extração é a separação dos metabólitos presentes nos tecidos de plantas, mediante o uso de solventes seletivos e procedimentos estabelecidos. O método selecionado vai depender da parte da planta utilizada (folhas, cascas, raízes, frutos), podendo-se aplicar métodos contínuos e descontínuos, com ou sem aplicação de calor, bem como da granulometria, do solvente utilizado, teor de umidade e natureza da amostra (SONAGLIO et al., 2004).

O processo de extração está relacionado com a difusão das substâncias presentes nos órgãos vegetais para o líquido extrator, desta forma os fatores relacionados aos métodos extrativos vão estar ligados à agitação, temperatura e tempo. A agitação e a temperatura podem diminuir o tempo de extração, a primeira por interferir diretamente na velocidade de dissolução, e a outra por aumentar a solubilidade das substâncias. Porém, nem sempre é vantajoso o aumento de temperatura, pois alguns compostos são instáveis (FÔNSECA, 2005).

Entre os fatores que interferem no teor de compostos a serem extraídos, o solvente escolhido tem se mostrado de extrema importância, pois além de analisar a eficiência em extrair o metabólito desejado, deve-se levar em consideração a toxicidade e risco de manuseio, o custo, a disponibilidade e a estabilidade das substâncias extraídas (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2004; MARQUES; VIGO, 2009).

A polaridade do solvente também interfere significativamente na retirada dos compostos presentes nas amostras vegetais, pois está relacionada com a seletividade do método. O grau de polaridade do grupo a ser extraído determina o solvente a ser utilizado (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2004). Além dos diferentes solventes, as misturas hidroetanólicas também alteram a polaridade. Estudos mostram que porcentagem alcóolica altera o rendimento do

processo, pois pode ocorrer dos compostos apresentarem muitas hidroxilas livres, mas com cadeias carbônicas longas ou anéis aromáticos, levando à alteração da solubilidade (MARQUES; VIGO, 2009).

Outro fator determinante é o tempo de extração, que varia de acordo com a parte da planta utilizada, processos mais demorados são utilizados para partes duras. Também é dependente do solvente utilizado e da finalidade do processo, muitas vezes é necessário um tempo maior para esgotamento da matéria vegetal (FÔNSECA, 2005).

Da mesma forma que os fatores mencionados acima, a proporção droga vegetal/solvente pode ser considerada uma condição limitante no processo extrativo, pois interfere na saturação do líquido extrator utilizado (PEIXOTO, 2012).

De acordo com o objetivo dos extratos obtidos é possível escolher o método extrativo mais adequado, avaliando disponibilidade e custo do processo, a eficiência e estabilidade do extrato (SONAGLIO et al, 2004).

- Maceração

A maceração foi utilizada por muito tempo pela população na preparação de tônicos e chás, tornando a maneira mais comum e barata de obtenção de substâncias ativas a partir das plantas (AZMIR et al., 2013). Consiste na extração da matéria-prima vegetal através do contato com o solvente por tempos prolongados, ocorre em recipiente fechado, em diversas temperaturas, podendo ser estática ou com ocasionais agitações (ALMEIDA et al., 2010).

Os fatores limitantes deste método estão ligados às amostras vegetais, como granulometria, teor de umidade, concentração e seletividade do solvente escolhido. Além disso, não leva ao esgotamento total devido ao esgotamento do líquido extrator ou pelo equilíbrio entre o solvente e o interior das células (MARQUES; VIGO, 2009).

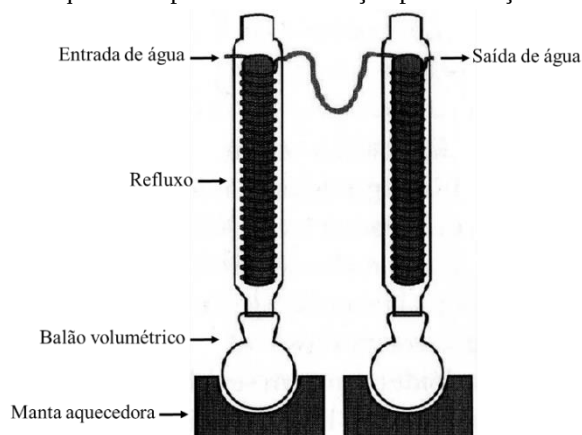
Esta operação apresenta algumas variações que visam otimizar a eficiência de extração. Desta forma, a maceração pode ser considerada uma digestão, quando é realizada em um sistema aquecido entre 40 e 60°C. Maceração dinâmica quando é feita sob agitação constante e remaceração quando mantêm-se o material vegetal e o líquido extrator é renovado várias vezes (SONAGLIO et al, 2004).

- Decocção

Decocção consiste em um método extrativo onde a amostra vegetal fica em contato com o solvente em ebulição (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2004). Pode ser utilizado para partes mais duras das plantas (cascas e raízes), como também para compostos termoestáveis como taninos e flavonoides (MARQUES; VIGO, 2009).

Este método também pode ser realizado com refluxo, onde as amostras vegetais são colocadas em um balão acoplado a um condensador e aquecido por uma manta térmica por tempo determinado (MARQUES; VIGO, 2009), como mostra a figura 4.

Figura 4 – Esquema do processo de extração por decocção com refluxo.



Fonte: Marques e Vigo (2009, p. 174).

- Turbólise

A técnica de extração através da redução do tamanho das partículas e rompimento das células, chamada de turbólise, resulta da aplicação de elevadas forças de cisalhamento em rotações de 5000 a 20000 rpm (SONAGLIO et al., 2004).

Apresenta um rendimento alto devido à diminuição do tamanho das partículas pela trituração que auxilia o contato constante com o solvente e homogeneização contínua. Sendo um método relativamente rápido, em ordem de minutos, e chega quase ao esgotamento da amostra vegetal (ALMEIDA et al., 2010).

Entre as desvantagens do processo encontra-se a geração de calor, a dificuldade na filtração da solução extrativa e limitações de uso para extração de cascas, raízes ou materiais de dureza elevada (MARQUES; VIGO, 2009; SONAGLIO et al., 2004).

- Extração assistida por ultrassom

No processo extrativo com ultrassons utilizam-se correntes de alta frequência que promovem a fragmentação das membranas celulares do material vegetal, tornando mais fácil a liberação dos constituintes químicos (HUIE, 2002).

As ondas emitidas pelo aparelho de ultrassom provocam o fenômeno chamado de cavitação, que é o processo de formação de bolhas devido à transmissão de ondas pelo meio, ocorrendo uma conversão da energia cinética em calor para o aquecimento do conteúdo da bolha. Apenas meios líquidos ou sólidos com líquidos podem provocar este efeito. Desta forma,

facilita a remoção e dissolução dos constituintes presentes na matriz celular vegetal (AZMIR et al., 2013).

Os fatores que podem interferir na extração são a frequência, a temperatura, a pressão e o tempo de sonicação que regulam a ação dos ultrassons, além da granulometria, teor de umidade e solvente utilizado (AZMIR et al., 2013).

- Extração assistida por micro-ondas

Na extração assistida por micro-ondas, o aquecimento do solvente é viabilizado pelo uso contínuo da pressão (HUIE, 2002). A radiação emitida pelo micro-ondas provoca alterações na estrutura celular dos tecidos vegetais, associadas ao gradiente de concentração e temperatura que atuam na mesma direção, aceleram o processo extrativo (YEDHU KRISHNAN; RAJAN, 2016).

Por isso é considerado um método rápido, quando comparado a métodos como Soxhlet ou decocção, e permite a redução no volume de solvente utilizado (YEDHU KRISHNAN; RAJAN, 2016; HUIE, 2002). O processo é dependente da composição e volume do solvente, da temperatura de extração e das características do material vegetal (HUIE, 2002).

2.3. Planejamento Fatorial

O planejamento fatorial é uma ferramenta utilizada na otimização de sistemas e processos (MIGLIATO et al., 2011), é o método mais indicado quando se deseja avaliar a influência de duas ou mais variáveis. São normalmente representados com b^k , onde “b” é o número de níveis e “k” o de fatores. Os estudos 2^k são os mais comuns (CUNICO et al., 2008).

É um método de estudo que apresenta inúmeras vantagens e torna a obtenção de resultados mais rápida, pois consegue reduzir o número de ensaios sem perder a qualidade nas informações obtidas, pode avaliar as variáveis ao mesmo tempo e os efeitos que causam, além de determinar a confiabilidade dos resultados (CUNICO et al., 2008; GHOSH; FLORES, 2013).

Alguns termos são essenciais para o entendimento e aplicação das técnicas de planejamento, são eles:

- Fatores: são as variáveis que influenciam a resposta;
- Níveis: são as diferentes condições experimentais de um fator, identificados por nível baixo (-) e nível alto (+);

- Modelo estatístico (superfície de resposta): função que descreve a influência dos fatores sobre a resposta;
- Efeito: alteração causada na resposta com a mudança dos níveis (CUNICO et al., 2008; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

A técnica estatística de otimização baseada no uso de planejamentos fatoriais é a metodologia de superfície de resposta, neste procedimento o primeiro passo é identificar a função matemática que modele a variação da resposta em função da variação dos fatores analisados, onde a primeira função utilizada são polinômios de primeira ordem (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Porém a função que melhor descreve modelos que maximizam ou minimizam respostas são os polinômios de segunda ordem, e a adequação do sistema é avaliada pela análise de variância - ANOVA (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Devido à extração ser uma das principais formas de obtenção de compostos ativos a partir de materiais vegetais, e pode sofrer influência de diversos fatores, é o principal alvo de planejamentos fatoriais, com o objetivo de avaliar quais os mais significativos para a extração do grupo de metabólitos desejados (WONG et al., 2015; ZHU; LIU, 2013; MA et al., 2012).

A necessidade de otimizar o processo extrativo tanto no ramo da investigação quanto na produção industrial leva a estudos como o de Grosso e colaboradores (2014), que avaliaram a influência da proporção de metanol, tempo de extração, temperatura utilizada no método e proporção massa/ solvente sobre o teores de compostos fenólicos nos extratos de partes aéreas de *Chelidonium majus*, sendo o teor de metanol e a proporção massa/ solvente os mais significativos na extração dos metabólitos analisados.

Os estudos de Lima e colaboradores (2015) avaliaram a influência do método extrativo, do solvente utilizado e da proporção de amostra vegetal na extração de flavonoides de *Lippia sidoides* através de um planejamento fatorial 2^3 , onde as condições para encontrar os maiores teores foram etanol 50% (v/v), proporção 7,5% (m/v), utilizando decocção como método de extração.

Outros testes utilizaram um planejamento fatorial 3^2 para determinar as melhores condições de extração de flavonoides presentes nas partes aéreas de *Ipomoea pes-caprae*, avaliando desta forma a influência exercida pelo tempo de extração e proporção droga/ solvente (m/v) no processo de maceração, além de avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dos extratos. O melhor resultado foi obtido com um tempo de 10 dias e proporção de 12,5% (VIEIRA et al., 2013).

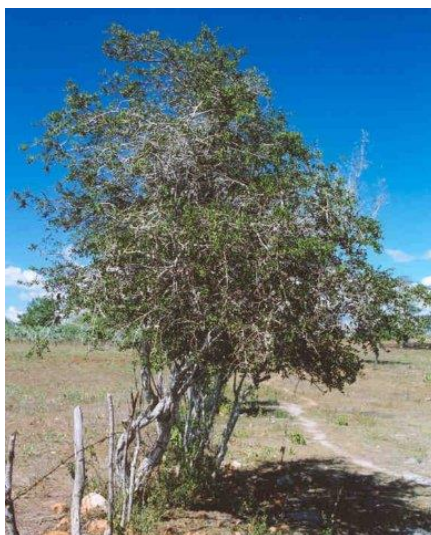
2.4. Maytenus - aspectos botânicos, fitoquímicos e farmacológicos

A família Celastraceae (Ordem Celastrales) é representada por espécies de porte arbustivo ou arbóreo distribuídos em 85 gêneros e 900 espécies, presentes em climas tropicais e subtropicais (ESTEVAM et al., 2009). Geralmente crescem como pequenas árvores e possuem folhas e cascas resinosas (SPIVEY et al., 2009). As espécies desta família apresentam metabólitos fenólicos, tais como flavonoides, triterpenos e taninos condensados (COSTA et al., 2008).

Entre os gêneros da família Celastraceae, encontra-se o gênero *Maytenus*, inserido na subfamília Celastroideae e é o mais numeroso (JOFFILY; VIEIRA, 2005) e boa parte das espécies pode ser encontrada no bioma da Caatinga (ROCHA et al., 2004). Espécies deste gênero são amplamente utilizadas pela medicina popular, principalmente na região Nordeste, por isso o aumento do interesse em estudos farmacológicos, botânicos e fitoquímicos com as mesmas (ROCHA et al., 2004).

Maytenus rigida Mart. (Figura 5) é encontrada em ambientes de Caatinga e Cerrado, é uma espécie considerada nativa do Nordeste brasileiro, onde apresenta maior distribuição (ROCHA et al., 2004). Estudos mostraram que as cascas, entrecascas, folhas, flores e raiz desta espécie são utilizadas na medicina popular para tratar problemas renais e hepáticos, reumatismo, ulcerações, dores e inflamações em geral (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Figura 5 – Indivíduo adulto de *Maytenus rigida* Mart.



Fonte: Centro Nordestino de Informações sobre Plantas (2015)

A espécie *Maytenus rigida* é conhecida popularmente como “bom-nome”, árvore de pequeno porte, com folhas coriáceas de bordas espinhosas, casca lisa e fosca (ROCHA et al.,

2004). Nas análises fitoquímicas apresenta alcaloides, esteroides, quinonas, triterpenos da série lupano, taninos e flavonoides (SANTOS et al., 2011).

Segundo os estudos de Rocha (2003), desta espécie já foram isolados triterpenos, sesquiterpeno e alcaloide de extratos das cascas das raízes.

Nos extratos fracionados de entrecascas do caule de bom-nome foi possível encontrar compostos fenólicos, terpenos, esteroides e saponinas nas frações etanólicas e de média polaridade, como clorofórmica e acetato de etila. O extrato bruto obtido neste mesmo teste foi considerado ativo frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (ESTEVAM et al., 2009).

O mesmo pode ser observado nos estudos de Santos e colaboradores (2011), os extratos etanólicos brutos e a fase acetato de etila obtidos a partir das entrecascas do caule de *Maytenus rigida* mostraram-se ativos frente a linhagens ATCC e isolados clínicos de *S. aureus*.

Os extratos etanólicos das cascas de bom-nome e suas frações foram avaliadas quanto a atividade nociceptiva através do teste de retirada de cauda, a ação foi encontrada apenas nas frações clorofórmica, acetato de etila e metanólica, apresentando a catequina como metabólito comum a todas (DIAS et al., 2007).

A ação destes mesmos extratos foi confirmada nos testes feitos por Martins e colaboradores (2012), onde observou-se o alívio da dor induzida no teste de placa quente e teste de contorção através da injeção de ácido acético e pode evidenciar a ação da catequina encontrada nos extratos tanto a nível central quanto periférico.

Além das atividades mencionadas anteriormente, outras podem ser atribuídas aos extratos etanólicos de *Maytenus rigida*, como anti-inflamatória, prevenção de úlcera gástrica e antidiarreica, que justificam o uso popular desta espécie (SANTOS, 2007).

Outra espécie deste gênero, *Maytenus ilicifolia*, conhecida popularmente por “espinheira santa”, é comumente utilizada no tratamento de problemas estomacais e estudos em modelos experimentais mostraram atividade gastroprotetora com administração oral e intraperitoneal dos extratos (BAGGIO et al., 2007), além de antioxidante e antimutagênico (VELLOSA et al., 2006; BAGGIO et al., 2007).

A espinheira-santa também foi avaliada quanto à atividades mutagênicas, ação abortiva, agente antifúngico e observados os efeitos tóxicos, onde as ações farmacológicas desta espécie estão relacionadas com a presença de triterpenos aromáticos, flavonoides, triterpenos glicosolados e agentes antioxidantes (DUARTE; DEBUR, 2005), compostos fenólicos e alcaloides sesquiterpênicos (VELLOSA et al., 2006).

Triterpenos isolados de *Maytenus blepharodes* mostraram atividade citotóxica frente a duas linhagens de células tumorais (HeLa e Hep-2) e potencial atividade antimicrobiana

(RODRÍGUEZ et al., 2005). Espécies do gênero *Maytenus* são amplamente utilizadas pela medicina popular, principalmente na região nordeste, por isso o aumento do interesse em estudos farmacológicos, botânicos e fitoquímicos com as mesmas (ROCHA et al., 2004).

2.5. Atividade antimicrobiana e metabólitos secundários

O uso excessivo de antibióticos tem levado ao desenvolvimento de microrganismos resistentes, por isso a descoberta de novas moléculas com atividade antimicrobiana é assunto de extrema importância e urgência (ESTEVAM et al., 2009).

A resistência bacteriana pode ser determinada como a habilidade das bactérias em sobreviver mediante a presença de concentrações de antibióticos que normalmente inibiriam ou levariam a morte de outras da mesma espécie (ALÓS, 2015).

Entre as bactérias que mais apresentam interesse clínico estão *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, pois apresentam maior contaminação ambiental, principalmente em hospitais, sendo responsáveis pela maioria das infecções nosocomiais (ESTEVEZ et al., 2014).

O gênero *Staphylococcus* é composto por bactérias Gram-positivas, que se ordenam em cachos irregulares, não esporuladas, aeróbias ou anaeróbias facultativas (BERNARDES; JORGE; LEÃO, 2004; ESTEVES et al., 2014). Fazem parte da microbiota transitória ou habitante dos seres humanos, sendo responsáveis pela maioria das infecções primárias na corrente sanguínea e no trato respiratório (ESTEVEZ et al., 2014).

Neste gênero destaca-se a espécie *Staphylococcus aureus*, que apresenta maior incidência nas infecções hospitalares, sendo uma das primeiras bactérias a adquirir resistência aos antibióticos (BERNARDES; JORGE; LEÃO, 2004; SIEBRA et al., 2016). As infecções causadas por esta espécie são um dos maiores desafios encontrados na clínica, pois apresentam alta capacidade de desenvolvimento de resistência devido a maior adaptação sob pressão seletiva do uso intenso de antimicrobianos (WEIGEL et al., 2007).

O aumento da resistência das bactérias aos fármacos atuais tem levado ao aumento da taxa de mortalidade e morbidade nos hospitais, além de levar as indústrias à uma corrida em busca de novas drogas com ação antimicrobiana. Desta forma, torna-se essencial uma busca e identificação adequada da bactéria a ser tratada, a fim de diminuir o uso inadequado dos antibióticos (ALÓS, 2015).

O uso de compostos obtidos a partir de plantas tem se mostrado uma alternativa em potencial, pois além de agir diretamente nos microrganismos, pode modular a ação de agentes

antimicrobianos, aumentando ou diminuindo a atividade destes fármacos (AGUIAR et al., 2015).

Neste contexto, produtos de origem vegetal são agentes em potencial, devido a diversidade de estruturas químicas (TCHINDA et al., 2016; SIEBRA et al., 2016), além de que, segundo a OMS, boa parte da população depende de medicamentos provenientes de plantas para tratamentos de diversas doenças (TCHINDA et al., 2016).

Por serem misturas heterogêneas, constituídas por vários metabólitos, os extratos vegetais apresentam baixa possibilidade dos microrganismos desenvolverem resistência a sua ação, pois devido à complexidade dificulta a adaptação microbiana (SIEBRA et al., 2016).

Entre os metabólitos secundários produzidos pelas plantas destacam-se os compostos fenólicos, principalmente os taninos e flavonoides, devido à maior atividade antimicrobiana e amplo espectro de ação, sendo capazes de anular os fatores de virulência bacteriana (DAGLIA, 2012).

Segundo Loguercio e colaboradores (2005), os taninos podem apresentar três diferentes mecanismos de ação na atividade microbiana: complexar com os substratos de enzimas bacterianas, agir nas membranas celulares e complexar com íons metálicos. Em todos os casos, afeta diretamente o metabolismo bacteriano e fúngico, impedindo o desenvolvimento ou levando à morte do microrganismo.

Os taninos apresentam ação frente a uma série de bactérias, dentre elas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* e, em concentrações mínimas pode inibir fungos como *Fomes annosus* (CASTRO et al., 1999).

De maneira geral, os flavonoides agem inibindo as enzimas bacterianas ou interferindo nas vias de síntese das mesmas. Isto ocorre devido às hidroxilas dos grupos fenólicos que apresentam afinidade pelas proteínas e favorecem essa complexação com as enzimas (ÁVILA et al., 2008).

Os estudos de Wang e colaboradores (2010) mostraram que a isoflavona extraída da soja apresenta ação antimicrobiana através do mecanismo de inibição da síntese da DNA topoisomerase, que interfere na replicação do DNA. Outros estudos deste mesmo grupo já haviam mostrado a atividade deste composto frente à *Staphylococcus aureus*, que pode agir afetando a integridade da membrana celular e impedindo o metabolismo e síntese proteica bacteriana.

Além destes, outros compostos do metabolismo secundário das plantas também apresentam ação antimicrobiana comprovada, como terpenoides, cumarinas e alcaloides (SILVA et al., 2010).

Para a determinação da atividade antimicrobiana são empregados diversos métodos “*in vitro*”, aplicados como triagem de novas substâncias bioativas. Os métodos mais utilizados são os de difusão em ágar, macrodiluição e microdiluição (OSTROSKY et al., 2008).

Os testes de difusão em ágar são métodos quantitativos que fundamentam-se na difusão da substância testada, em um meio de cultura sólido e com microrganismo inoculado. O resultado baseia-se na relação entre o halo de inibição e a quantidade de substância aplicada. Para esta metodologia são utilizadas técnicas de aplicação em discos, perfuração em ágar e cilindros de aço inoxidável (SILVEIRA et al., 2009).

Para a determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB) e Concentração Mínima Inibitória (CMI) são utilizados os métodos de macrodiluição e microdiluição, sendo este último o mais empregado, por apresentar um menor custo, pois necessita de um quantitativo menor de substrato e de manuseio mais simples (BONA et al., 2014).

Diversos fatores podem interferir nestas metodologias, como o pH do sistema, as condições de cultivo, a disponibilidade de oxigênio no meio, o inóculo e os meios de cultura utilizados (OSTROSKY et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Otimizar o processo de extração de compostos fenólicos das folhas e cascas de *Maytenus rigida* Mart. através da análise por ensaios fitoquímicos e microbiológicos.

3.2. Objetivos específicos

- Obter extratos brutos por diferentes métodos extrativos;
- Caracterizar quimicamente as classes de polifenóis presentes nestes extratos;
- Quantificar por espectrofotometria UV o conteúdo de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas;
- Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos a partir de diferentes métodos extrativos;
- Realizar um planejamento fatorial do extrato mais promissor visando a obtenção de um extrato enriquecido em compostos fenólicos e que possua elevado potencial antimicrobiano.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta do material vegetal

As amostras de cascas e folhas de *Maytenus rigida* foram coletadas em Junho de 2015 (Figura 6), no município de Altinho, distante 163 km do Recife, localizado no Agreste Central de Pernambuco que possui área total de 454,484 km² e clima Bsh (semi-árido quente) (IBGE, 2010). Após a coleta, as amostras foram condicionadas em sacos de papel até o processo de secagem.

Figura 6 – Coleta das amostras de *Maytenus rigida* na Comunidade do Carão, Altinho - PE.



Fonte: Autor.

4.2. Preparação dos extratos

O material vegetal coletado foi reduzido a partes menores, a fim de aumentar a superfície de contato e evitar contaminação, e submetido a secagem em temperatura ambiente por duas semanas, não sendo suficiente para a total desidratação, foi colocado em estufa a 40°C. Após secagem, as amostras foram pulverizadas em moinho vertical de facas tipo Willye (Adamo 340) e padronizadas em tamises, obtendo granulometria de 20 Mesh (1,2 mm), sendo acondicionadas em sacos de papel até a preparação dos extratos.

Após este processo, as amostras de cascas e folhas foram submetidas a cinco diferentes métodos extrativos: maceração, decocção sob refluxo, turbólise, ultrassom e micro-ondas. Utilizando como solvente solução hidroetanólica 70% e na proporção 1:10 (g/mL). A amostra vegetal foi submetida a três macerações, com renovação do solvente a cada 48h. A decocção foi feita em manta aquecedora, por 30 minutos, contados após a ebulição do solvente. Os extratos por turbólise foram obtidos em liquidificador industrial, durante 30 minutos (6 ciclos de 5 minutos, com intervalos de 2 minuto entre eles). Foi utilizado o ultrassom Unique® modelo UltraCleaner 1400A para obtenção dos extratos, com duração de 60 minutos e aquecimento fixo ($60 \pm 5^\circ\text{C}$). Na extração assistida por micro-ondas, a determinação da potência e do tempo de extração foi dependente da fórmula física que relaciona a quantidade de calor com potência ($Q = m \times c \times \Delta t$) a fim de obter a temperatura de ebulição do solvente utilizado. Os extratos

foram obtidos utilizando um micro-ondas Panasonic Piccolo, 70% da potência e no tempo de 1 minuto.

Os extratos provenientes dos cinco métodos foram filtrados e submetidos à evaporação sob pressão reduzida, à temperatura de $40 \pm 5^\circ \text{C}$, até total seca.

4.3. Análises fitoquímicas

As análises qualitativas dos compostos fenólicos foram realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD) de gel de sílica desenvolvida por sistemas eluentes e reveladores de acordo com os métodos descritos na Tabela 1 (WAGNER; BLADT, 1995).

Tabela 1 - Sistemas de eluição, padrões e reveladores utilizados para evidenciar a presença dos compostos fenólicos.

Grupo	Sistema eluente	Padrão	Revelador
Compostos Fenólicos	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Rutina	NEU
Taninos hidrolisáveis	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Ácido gálico Ácido tânico	FeCl_3
Taninos condensados	Acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5)	Catequina	Vanilina clorídrica
Cumarinas	Tolueno: éter (1:1 saturado com ácido acético a 10%)	Cumarina Dihidroxycumarina	KOH etanólico 10%

4.3.1. Determinação do conteúdo fenólico total

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi baseada pelo método descrito por Amorim et al., 2008. O extrato seco foi diluído em metanol P.A numa concentração de 1mg/mL em balão volumétrico de 25 mL, em triplicata.

Para o doseamento foram transferidos 200 μL do extrato solubilizado para tubos de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 0,5 mL da solução do reagente Folin-Ciocalteu, 1 mL da solução de carbonato de sódio e 8,3 mL de água destilada. As amostras permaneceram

em repouso por 30 minutos ao abrigo da luz e temperatura ambiente. A absorbância da mistura foi medida a 760 nm contra um branco preparado com água destilada.

A curva de calibração (alíquotas de 50 μ L – 1 mL) foi preparada com uma solução padrão de ácido tânico (1 mg/mL) e todos os demais reagentes citados anteriormente, aferindo-se o volume final para 10 mL com água destilada. As concentrações finais obtidas do ácido tânico foram de 0,5 a 10,0 μ g/mL. A cor azul produzida pela reação possui uma absorção máxima a 760 nm e é proporcional à taxa de compostos fenólicos. O teor de fenóis totais foi expresso como miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de extrato (mg EAT/g).

4.3.2. Determinação do conteúdo de taninos

Assim como na metodologia anterior, a determinação do teor de taninos foi realizada segundo protocolo desenvolvido por Amorim e colaboradores (2008). O extrato seco foi diluído em metanol P.A numa concentração de 1mg/mL em balão volumétrico de 25 mL, em triplicata.

Posteriormente, foram pesados 1 g de caseína e transferidos para erlenmeyer de 50 mL, acrescentando 6 mL da amostra diluída e 12 mL de água destilada, em triplicata. Após 3 horas de reação (para precipitação dos taninos com a proteína), filtrou-se a solução em balão volumétrico e completado o volume para 25 mL com água destilada. Foi retirada uma alíquota de 1 mL e quantificados os fenóis residuais pelo método Folin-Ciocalteu. O teor de taninos foi calculado pela diferença entre o conteúdo de fenóis totais e fenóis residuais. Utilizando o ácido tânico como padrão.

4.3.3. Determinação do conteúdo de flavonoides

Para determinação do conteúdo de flavonoides baseou-se na metodologia descrita por Peixoto Sobrinho e colaboradores (2008).

O extrato seco foi diluído em metanol P.A numa concentração de 1mg/mL. Para quantificar os flavonoides, uma alíquota de 0,2 mL do extrato diluído foi transferida para tubos de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 0,120 mL de ácido acético glacial, 2 mL da solução de piridina (20%, v/v em metanol P.A), 0,5 mL do reagente cloreto de alumínio (5%, p/v em água destilada) e completado o volume para 10 mL com água destilada em cada tubo. Após a preparação desta solução, agitou-se adequadamente, permanecendo em repouso por 30 minutos, ao abrigo da luz, a temperatura ambiente. Após esse período, a absorbância da mistura foi medida a 420 nm contra um branco preparado com água destilada.

A curva de calibração foi construída com uma solução padrão de rutina (0,1 mg/mL em metanol), obtendo as concentrações finais de 0,5 a 20,0 µg/mL. O teor de flavonoides totais foi expresso como miligramas equivalente de rutina por grama de extrato (mg ER/g).

4.3.4. Determinação do conteúdo de cumarinas

Para quantificar o conteúdo de cumarinas foi utilizada a metodologia descrita por Osório e Martins (2004) com adaptações.

Foram transferidos 0,5 mL do extrato diluído (1,0 mg/mL) para tubos de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de água destilada e 0,5 mL da solução de acetato de chumbo. Agitou-se a amostra e, em seguida, foram adicionados 7 mL de água destilada. Desta solução, 2 mL foram transferidos para novos tubos de ensaio e adicionados 8 mL da solução de ácido clorídrico (37% puro). A absorbância da mistura foi medida a 320 nm contra um branco preparado com água destilada.

A curva de calibração foi preparada com uma solução padrão de 1,2-benzopirona e todos os demais reagentes citados anteriormente para os extratos, as concentrações finais de cumarina ficaram entre 0,4 - 20,0 µg/mL. O teor de cumarinas totais foi expresso como miligramas equivalente de cumarina por grama de extrato (mg EC/g).

4.4. Atividade antimicrobiana

4.4.1. Microrganismos utilizados

Os extratos foram testados frente a microrganismos pertencentes à coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Representantes dos grupos de bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01); *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16); *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138); *Micrococcus luteus* (UFPEDA 06); bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (UFPEDA 224); *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39); *Serratia marcescens* (UFPEDA 398); Bacilo álcool-ácido resistente: *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71); e levedura *Candida albicans* (UFPEDA 1007). Além destes, os extratos obtidos no planejamento fatorial foram testados frente a cinco cepas de isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*: secreção de úlcera (UFPEDA 700); ponta de cateter (UFPEDA 725); orofaringe (UFPEDA 728); secreção de ferida operatória (UFPEDA 731); e fragmento ósseo (UFPEDA 732).

4.4.2. Teste de difusão em disco de papel

A atividade antimicrobiana foi verificada “*in vitro*”, pelo método de difusão em disco de papel (BAUER et al., 1966). A concentração do extrato utilizada foi de 100.000 µg/mL em dimetilsufóxido (DMSO) e os discos de papel de 6 mm de diâmetro embebidos com 20 µL da solução correspondente a 2.000 µg do extrato bruto ou frações por disco. As suspensões foram padronizadas segundo a escala de McFarland no grau de turvação de 0,5 (BARRY et al., 1986; KONEMAN et al., 1997), o que corresponde a uma concentração de aproximadamente 10^{7-8} UFC/mL.

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados com halos menores que 9 mm foram considerados indicativos de inatividade, 9 - 12 mm parcialmente ativo, 13 - 18 mm ativo, maiores que 18 foram considerados muito ativos (ALVES et al., 2000). O antibiótico Gentamicina e o antifúngico Cetoconazol foram utilizados como fármacos padrões (10 µg/disco e 30 µg/disco, respectivamente). Para os isolados clínicos de *S. aureus*, utilizaram-se como padrões os antibióticos Eritromicina (15 µg/disco) e Oxacilina (1 µg/disco).

4.5. Planejamento Fatorial

Com base no experimento de fator-único, que avaliou a influência de cada método extrativo, foi escolhido um dentre eles para a realização de um planejamento fatorial a fim de selecionar as melhores condições de extração de compostos fenólicos de *Maytenus rigida*. Para isso, foi realizado um planejamento 2^3 (3 variáveis, em 2 níveis de variação), com um ponto central em triplicata, a partir deste é construída a estimativa de erro e o grau de liberdade.

O teste foi feito de maneira randomizada e os valores dos níveis de variâncias estão na Tabela 2 para cascas e na Tabela 3 para folhas. Os níveis foram escolhidos a partir da literatura, havendo diferença apenas no nível superior do tempo para as cascas, por serem partes mais rígidas. O tratamento estatístico foi realizado utilizando software STATISTICA® e foram obtidos os efeitos padronizados (diagramas de Pareto) e as análises estatísticas (Superfície de Resposta) para avaliação dos resultados.

Tabela 2 – Níveis das variáveis do planejamento 2^3 para os extratos de cascas.

	-1 (Inferior)	0 (Ponto Central)	+ 1 (Superior)
Concentração (m/v)	1/20	1/10	1/5
EtOH/H₂O (%)	60	70	92,8
Tempo (min.)	15	30	60

Tabela 3 - Níveis das variáveis do planejamento 2^3 para os extratos de folhas.

	- 1 (Inferior)	0 (Ponto Central)	+ 1 (Superior)
Concentração (m/v)	1/20	1/10	1/5
EtOH/H₂O (%)	60	70	92,8
Tempo (min.)	15	30	45

Após a obtenção dos extratos, foram filtrados e submetidos à evaporação sob pressão reduzida, à temperatura de $40 \pm 5^\circ \text{C}$, até total secura. Posteriormente, realizou-se o doseamento dos fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas. Também foi realizada a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos pelo planejamento.

4.6. Análise estatística

Os teores dos metabólitos e os halos de inibição obtidos pelo teste antimicrobiano foram avaliados através da análise de variância de Kruskal Wallis seguido de comparações múltiplas pelo teste de Dunn. Foi utilizado o teste de correlação de Spearman para comparar o conteúdo fenólico total, de taninos, flavonoides e cumarinas entre eles e para relacioná-los com a inibição microbiana. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de $p < 0,05$. O programa BioEstat 5.0 foi utilizado para realização das análises estatísticas (AYRES et al., 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Fitoquímica

Nas análises qualitativas, a presença de compostos fenólicos foi avaliada por meio da cromatografia de camada delgada e os resultados estão presentes na tabela 4.

Tabela 4 – Análise química dos extratos de cascas e folhas de *Maytenus rigida* Mart. obtidos por cinco diferentes métodos extrativos.

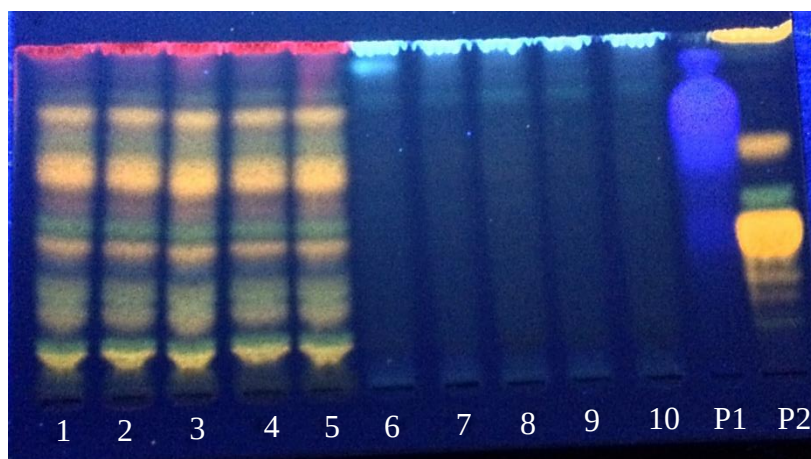
Classe de Compostos	Extratos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Compostos fenólicos	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+
Taninos Hidrolisáveis	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
Taninos Condensados	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
Flavonoides	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+
Cumarinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: 1 = folha decocção, 2 = folha micro-ondas, 3 = folha ultrassom, 4 = folha turbólise, 5 = folha maceração, 6 = casca decocção, 7 = casca micro-ondas, 8 = casca ultrassom, 9 = casca turbólise, 10 = casca maceração.

Foi possível observar a presença de todos os compostos avaliados nos diferentes extratos, havendo diferença apenas entre as partes utilizadas. As folhas apresentaram maior intensidade de compostos fenólicos (figuras 7, 8 e 9).

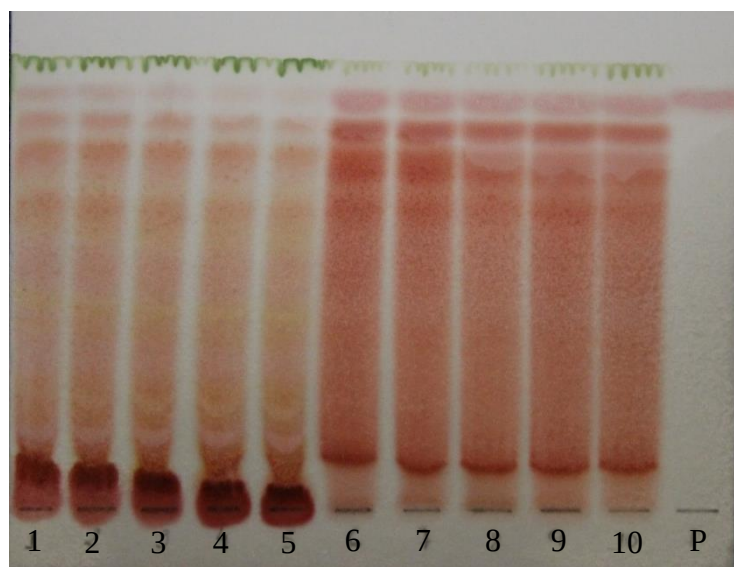
Os resultados encontrados nas análises cromatográficas corroboram com os estudos de Estevam e colaboradores (2009), que confirmam a presença de compostos fenólicos, flavonoides, catequinas e taninos nos extratos etanólicos da entrecasca de *Maytenus rigida*.

Figura 7 – Placa cromatográfica para presença de Compostos Fenólicos nos extratos de cascas e folhas de *Maytenus rigida*.



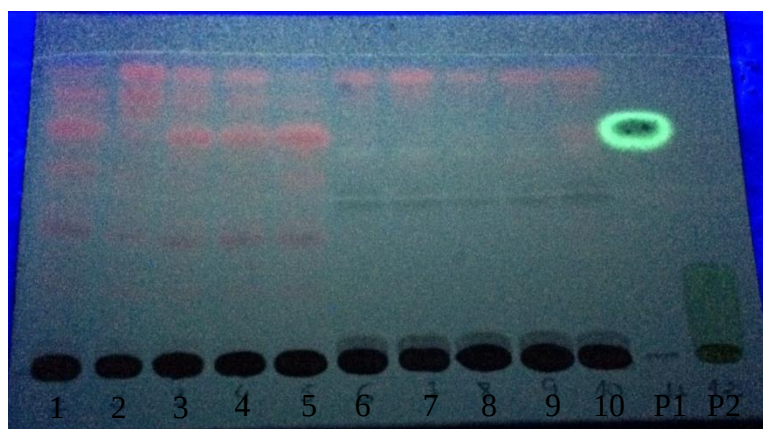
Fonte: Autor. Legenda: 1 = folha decocção, 2 = folha micro-ondas, 3 = folha ultrassom, 4 = folha turbólise, 5 = folha maceração, 6 = casca decocção, 7 = casca micro-ondas, 8 = casca ultrassom, 9 = casca turbólise, 10 = casca maceração, P1 = Ácido Tânico, P2 = Rutina.

Figura 8 – Placa cromatográfica para presença de Taninos Condensados nos extratos de cascas e folhas de *Maytenus rigida*.



Fonte: Autor. Legenda: 1 = folha decocção, 2 = folha micro-ondas, 3 = folha ultrassom, 4 = folha turbólise, 5 = folha maceração, 6 = casca decocção, 7 = casca micro-ondas, 8 = casca ultrassom, 9 = casca turbólise, 10 = casca maceração, P = Catequina.

Figura 9 – Placa cromatográfica para presença de Cumarinas nos extratos de cascas e folhas de *Maytenus rigida*.



Fonte: Autor. Legenda: 1 = folha decocção, 2 = folha micro-ondas, 3 = folha ultrassom, 4 = folha turbólise, 5 = folha maceração, 6 = casca decocção, 7 = casca micro-ondas, 8 = casca ultrassom, 9 = casca turbólise, 10 = casca maceração, P1 = Cumarina, P2 = Dihidroxycumarina.

Os teores de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas dos cinco diferentes métodos extrativos foram avaliados e os resultados obtidos nos doseamentos dos extratos de folhas e cascas são apresentados nas tabelas 5 e 6, respectivamente. Os valores expressos são as médias das replicatas acompanhadas do desvio padrão em mg/g equivalente de ácido tânico para fenóis totais e taninos, equivalente de rutina para flavonoides e equivalente de 1,2-benzopirona para as cumarinas.

O extrato das folhas obtido por decocção obteve maior teor de fenóis totais, taninos e flavonoides, apresentando valores de $459,35 \pm 3,39$ mg EAT/g, $385,6 \pm 10$ mg EAT/g e $156,78 \pm 6,88$ mg ER/g, respectivamente, porém não apresentou diferença estatística significativa dos extratos obtidos por micro-ondas e maceração. No que diz respeito ao teor de cumarinas, o método extrativo que forneceu extratos mais ricos foi micro-ondas ($144,60 \pm 13,26$ mg EC/g), contudo o teor apresentado não foi significativamente diferente dos extratos obtidos por decocção, maceração e turbólise.

Tabela 5 - Teores (mg/g) de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas, expressos em média $\pm$ desvio padrão, dos extratos obtidos a partir das folhas de *Maytenus rigida* Mart. por diferentes métodos extrativos.

Método extrativo	FT (mg EAT/g)	TAN (mg EAT/g)	FLA (mg ER/g)	CUM (mg EC/g)
Maceração	$434,36 \pm 5,42$ ab	$375,89 \pm 11,71$ ab	$138,68 \pm 9,1$ ab	$91,51 \pm 4,77$ ab
Micro-ondas	$439,34 \pm 8,85$ ab	$370,28 \pm 7,12$ abc	$152,83 \pm 8,43$ a	$144,60 \pm 13,26$ a
Decocção	$459,35 \pm 3,39$ a	$385,6 \pm 10,0$ a	$156,78 \pm 6,88$ a	$126,39 \pm 12,07$ a
Ultrassom	$392,44 \pm 3,46$ bc	$360,92 \pm 1,46$ bc	$62,64 \pm 2,16$ b	$66,67 \pm 7,10$ b
Turbólise	$382,60 \pm 5,74$ c	$351,61 \pm 7,31$ c	$74,36 \pm 0$ b	$121,84 \pm 7,13$ a

Legenda: FT = Fenóis Totais, TAN = Taninos, FLA = Flavonoides, CUM = Cumarinas. Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme Kruskall Wallis (seguido de Dunn), $p < 0,05$.

Em relação aos extratos obtidos das cascas, para fenóis totais o método extrativo que se destacou foi micro-ondas, que possibilitou a obtenção de $364,96 \pm 4,65$ mg EAT/g, no entanto, estatisticamente não observou-se diferença significativa dos extratos obtidos por maceração e decocção. Já para taninos, destacou-se o extrato obtido por decocção, apresentando valor de $264,58 \pm 4,08$ mg EAT/g, não apresentando diferença significativa dos extratos por maceração e decocção. Para flavonoides e cumarinas, obteve-se valores maiores no extrato obtido por maceração ($42,76 \pm 2,86$ mg ER/g e $83,35 \pm 2,37$ mg EC/g, respectivamente).

Tabela 6 - Teores (mg/g) de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas, expressos em média $\pm$ desvio padrão, dos extratos obtidos a partir das cascas de *Maytenus rigida* Mart. por diferentes métodos extrativos.

Método extrativo	FT (mg EAT/g)	TAN (mg EAT/g)	FLA (mg ER/g)	CUM (mg EC/g)
Maceração	$340,77 \pm 9,48$ ab	$261,87 \pm 9,44$ a	$42,76 \pm 2,86$ a	$83,35 \pm 2,37$ a
Micro-ondas	$364,96 \pm 4,65$ a	$230,85 \pm 14,69$ ab	$21,54 \pm 1,65$ ab	$62,31 \pm 4,27$ ac
Decocção	$356,60 \pm 2,11$ a	$264,58 \pm 4,08$ ac	$38,81 \pm 6,50$ a	$50,17 \pm 0,80$ bc
Ultrassom	$294,99 \pm 7,38$ b	$225,72 \pm 3,90$ b	ND b	$49,98 \pm 4,60$ b
Turbólise	$305,37 \pm 10,95$ b	$234,81 \pm 8,15$ bc	ND b	$52,83 \pm 2,83$ bc

Legenda: FT = Fenóis Totais, TAN = Taninos, FLA = Flavonoides, CUM = Cumarinas, ND = Não detectado. Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme Kruskall Wallis (seguido de Dunn), $p < 0,05$.

Processos extrativos com elevação de temperatura promovem uma maior solubilidade dos compostos a serem extraídos, além de diminuir a viscosidade e tensão superficial do solvente, o que facilita a retirada dos metabólitos presentes nas amostras vegetais, aumentando o rendimento do processo (DAI; MUMPER, 2010; MARQUES; VIGO, 2009). Esse fato justifica os maiores teores obtidos em métodos com aquecimento como decocção e micro-ondas.

Entre os cinco métodos extrativos, quanto à composição química, nos extratos obtidos a partir das folhas observou-se correlação positiva apenas entre o teor de fenóis totais e taninos ($r_s = 0,9$, $p = 0,0374$) e entre fenóis totais e flavonoides ($r_s = 0,9$, $p = 0,0374$). Nos extratos obtidos com as cascas não houve correlação entre o teor de compostos fenólicos totais e os demais metabólitos secundários estudados.

Maiores teores de taninos são esperados nas cascas, porém foi possível observar que esta classe de metabólitos obteve níveis maiores nos extratos de folhas. De acordo com Monteiro e colaboradores (2006), os teores de taninos podem variar entre as partes da planta de acordo com o período de coleta, sendo maiores nas cascas durante o período de seca. Já os flavonoides são comumente encontrados nas folhas, devido a maior exposição solar (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2009). As cumarinas não apresentam níveis elevados, apesar de serem sintetizadas nas folhas, seus maiores teores são encontrados nos frutos e raízes, podendo ocorrer variações nas partes devido a mudanças sazonais e ambientais (OJALA et al., 2000; GOBBONETO; LOPES, 2007).

5.2. Atividade antimicrobiana

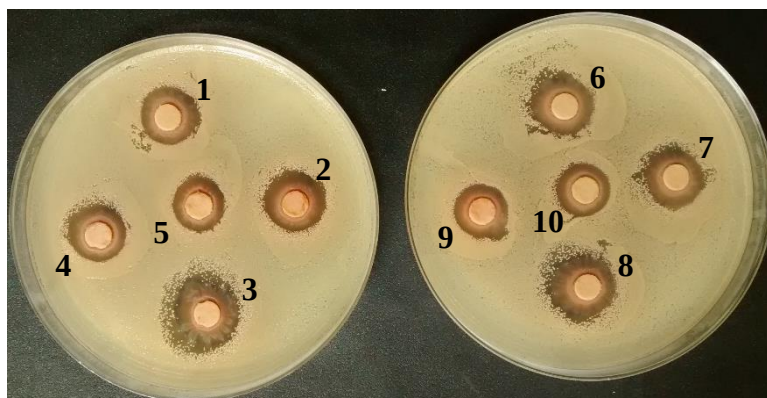
A presença de compostos com atividade antimicrobiana nos vegetais, bem como o uso destes para o tratamento de diversas infecções é bastante comum a muito tempo. As plantas desenvolveram a capacidade de produzir essas substâncias em reação aos diversos danos provenientes do ambiente, buscando proteger-se das infecções causadas por patógenos como bactérias e fungos (ESQUENAZI et al., 2002).

Os extratos de folhas e cascas de *Maytenus rigida* obtidos pelos cinco diferentes métodos extrativos foram testados frente a nove microrganismos e os resultados estão apresentados na tabela 7. Os valores são médias dos halos obtidos nas replicatas, expressos em milímetros. Para confirmação do perfil de sensibilidade e resistência das bactérias ensaiadas foi utilizado como antimicrobiano de referência a gentamicina para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e cetoconazol para leveduras.

Foi possível observar que os extratos submetidos ao ensaio apresentaram atividade apenas contra microrganismos Gram-positivos (*S. aureus*, *M. luteus* e *E. faecalis*). Isto pode ocorrer devido a diferença estrutural existente entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que dificulta a ação dos metabólitos presentes nos extratos ou pela baixa quantidade de compostos ativos, impedindo a ação frente microrganismos desta classe (DUARTE et al., 2014).

Para *S. aureus* (figura 10), os extratos de folhas e cascas obtiveram halos na faixa de 15,0 mm, não havendo diferença significativa entre os extratos obtidos pelos diferentes métodos extrativos, nem entre as partes da planta estudada, sendo considerados ativos frente este microrganismo. Para *M. luteus*, o mesmo pode ser observado, os extratos apresentaram halos entre 15 e 16 mm, sendo considerados ativos, segundo Alves e colaboradores (2000). Não apresentaram diferença significativa entre os métodos de extração, nem entre cascas e folhas.

Figura 10 - Placa de atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *Maytenus rigida* frente a *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Autor. Legenda: 1 = casca maceração, 2 = casca decocção, 3 = casca turbólise, 4 = casca ultrassom, 5 = casca micro-ondas, 6 = folha maceração, 7 = folha decocção, 8 = folha turbólise, 9 = folha ultrassom, 10 = folha micro-ondas.

Em relação aos resultados obtidos frente a *E. faecalis*, os extratos foram considerados parcialmente ativos, com halos na faixa de 10 mm, estatisticamente não há diferença entre os extratos dos diferentes métodos extrativos nem entre as partes vegetais utilizadas.

Os resultados dos testes antimicrobianos corroboram com os estudos de Costa e colaboradores (2013), mostrando que os extratos de *Maytenus rigida* apresentaram ação frente a *S. aureus* e *E. faecalis*, porém com halos de inibição menores (12 e 8,3 mm, respectivamente). Essa diferença de resultados pode ocorrer devido à variação de metodologias ou pelas características do material vegetal.

Tabela 7 – Atividade antimicrobiana (halos de inibição em mm $\pm$ desvio padrão) dos extratos hidroalcoólicos de cascas e folhas de *Maytenus rigida* obtidos por 5 métodos extrativos diferentes.

Microrganismos	Extratos										Padrões	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	P1	P2
<i>S. aureus</i> (UFPEDA 01)	15,0 $\pm$ 0,0	14,7 $\pm$ 0,6	14,7 $\pm$ 0,6	13,7 $\pm$ 0,6	14,7 $\pm$ 0,6	15,0 $\pm$ 0,0	14,0 $\pm$ 0,0	14,7 $\pm$ 0,6	15,0 $\pm$ 0,0	15,3 $\pm$ 0,6	28,3 $\pm$ 0,6	-
<i>M. luteus</i> (UFPEDA 06)	14,6 $\pm$ 0,6	13,0 $\pm$ 0,0	14,0 $\pm$ 0,0	14,7 $\pm$ 0,6	13,7 $\pm$ 0,6	16,0 $\pm$ 0,0	15,3 $\pm$ 0,6	15,0 $\pm$ 0,0	16,0 $\pm$ 0,0	15,3 $\pm$ 0,6	30,7 $\pm$ 1,2	-
<i>B. subtilis</i> (UFPEDA 16)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28,3 $\pm$ 0,6	-
<i>E. faecalis</i> (UFPEDA 138)	10,3 $\pm$ 0,6	9,7 $\pm$ 0,6	11,0 $\pm$ 1,0	10,3 $\pm$ 0,6	9,7 $\pm$ 0,6	10,6 $\pm$ 0,6	10,7 $\pm$ 0,6	10,3 $\pm$ 0,6	10,3 $\pm$ 0,6	10,0 $\pm$ 1,0	28,3 $\pm$ 0,6	-
<i>P. aeruginosa</i> (UFPEDA 39)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,7 $\pm$ 0,6	-
<i>E. coli</i> (UFPEDA 224)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23,3 $\pm$ 0,6	-
<i>S. marcescens</i> (UFPEDA 398)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26,3 $\pm$ 0,6	-
<i>M. smegmatis</i> (UFPEDA 71)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25,3 $\pm$ 0,6	-
<i>C. albicans</i> (UFPEDA 1007)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39,7 $\pm$ 0,6

Legenda: 1 = folha decocção, 2 = folha micro-ondas, 3 = folha ultrassom, 4 = folha turbólise, 5 = folha maceração, 6 = casca decocção, 7 = casca micro-ondas, 8 = casca ultrassom, 9 = casca turbólise, 10 = casca maceração, P1 = Gentamicina (10 μ g/disco), P2 = Cetoconazol (30 μ g/disco), (-) = sem atividade.

5.3. Planejamento Fatorial

A partir dos resultados encontrados nos testes anteriores, o método extrativo por decocção sob refluxo foi escolhido para ser feito o planejamento fatorial. Devido a não diferença significativa entre os métodos na atividade antimicrobiana, a escolha baseou-se no teor de compostos fenólicos extraídos e na praticidade e custo do processo.

Os extratos obtidos por decocção obtiveram níveis mais altos na maior parte dos grupos de compostos analisados, além de ser mais rápida e utilizar um volume menor de solvente, quando comparada com a maceração, da qual não houve diferença significativa e apresenta um menor custo quando comparada com a extração assistida por micro-ondas. Mesmo sendo um processo indicado para partes duras como cascas e raízes, foi escolhido o mesmo para folhas, devido aos metabólitos estudados serem termoeestáveis.

As variáveis e os níveis foram escolhidos de acordo com a influência que poderiam exercer na extração dos metabólitos secundários. Desta forma, foi avaliada a interferência da polaridade do solvente (teor alcóolico), concentração (proporção massa/ solvente) e tempo de extração.

A partir da matriz de planejamento experimental 2^3 foram obtidos 11 extratos de folhas e cascas, onde foram doseados os grupos de compostos fenólicos e os resultados encontram-se nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

Nos extratos de folhas, os maiores teores obtidos de fenóis totais e taninos foram obtidos no ensaio número 2 (proporção - 1/5, teor alcóolico – 60%, tempo de extração – 15 min.), não apresentando diferença significativa dos ensaios 3, 4, 6, 7 e 8. Todavia, para flavonoides e cumarinas as condições máximas do experimento (proporção - 1/5, teor alcóolico - 92,8%, tempo de extração – 45 min.) mostraram níveis mais altos.

Para os extratos de cascas, do mesmo modo que os resultados observados nas folhas, os teores mais altos de fenóis totais foram obtidos nas condições extrativas de número 2 (proporção - 1/5, teor alcóolico – 60%, tempo de extração – 15 min.), não houve diferença significativa de outros ensaios. Os teores de taninos foram maiores no ensaio de número 1 (proporção - 1/20, teor alcóolico – 60%, tempo de extração – 15 min.). Já os níveis de flavonoides e cumarinas foram maiores no ensaio de número 4, cujas condições extrativas são: proporção - 1/5, teor alcóolico - 92,8% e tempo de extração – 15 minutos.

Porém, a avaliação mais apropriada dos efeitos das variáveis nos teores dos metabólitos é feita através do diagrama de Pareto e do gráfico de Superfície de Resposta.

Tabela 8 - Teores (mg/g) de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas expressos em média $\pm$ desvio padrão dos extratos das folhas de *Maytenus rigida* obtidos a partir dos ensaios de planejamento fatorial.

Ensaio	Conc.	EtOH/ H ₂ O	Tempo	FT (mg EAT/g)	TAN (mg EAT/g)	FLA (mg ER/g)	CUM (mg EC/g)
1	-1	-1	-1	426,86 $\pm$ 15,02 ac	398,98 $\pm$ 8,54 ac	55,66 $\pm$ 6,16 a	78,80 $\pm$ 6,27 ac
2	1	-1	-1	467,72 $\pm$ 12,92 b	424,23 $\pm$ 14,27 ab	106,86 $\pm$ 28,31 ac	75,77 $\pm$ 5,91 a
3	-1	1	-1	465,53 $\pm$ 5,77 b	424,47 $\pm$ 2,09 b	171,20 $\pm$ 0,97 bd	107,05 $\pm$ 1,39 ad
4	1	1	-1	454,90 $\pm$ 8,44 ab	409,67 $\pm$ 7,42 abd	240,85 $\pm$ 2,31 bd	135,87 $\pm$ 7,97 bd
5	-1	-1	1	411,02 $\pm$ 2,53 c	374,39 $\pm$ 6,55 cd	82,72 $\pm$ 8,34 a	76,53 $\pm$ 5,61 ac
6	1	-1	1	447,34 $\pm$ 8,41 abc	398,46 $\pm$ 12,56 abd	131,94 $\pm$ 12,83 ac	80,70 $\pm$ 4,31 ac
7	-1	1	1	443,57 $\pm$ 3,59 abc	394,43 $\pm$ 7,57 abd	171,99 $\pm$ 5,11 bcd	125,82 $\pm$ 4,83 cd
8	1	1	1	457,09 $\pm$ 9,45 ab	404,86 $\pm$ 4,58 abd	261,09 $\pm$ 14,54 bd	149,15 $\pm$ 8,87 bd
9*	0	0	0	446,56 $\pm$ 8,74 abc	387,96 $\pm$ 12,32 ad	170,36 $\pm$ 15,02 bcd	115,40 $\pm$ 9,35 ad
10*	0	0	0	431,90 $\pm$ 10,02 ac	373,12 $\pm$ 15,96 cd	151,42 $\pm$ 11,15 ad	130,38 $\pm$ 3,22 bd
11*	0	0	0	429,73 $\pm$ 1,71 ac	387,40 $\pm$ 4,32 cd	146,74 $\pm$ 9,56 ad	128,86 $\pm$ 4,74 bd

Legenda: FT = Fenóis Totais, TAN = Taninos, FLA = Flavonoides, CUM = Cumarinas, * = ponto central em triplicata. Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme Kruskal Wallis (seguido de Dunn), $p < 0.05$.

Tabela 9 - Teores (mg/g) de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas expressos em média $\pm$ desvio padrão dos extratos das cascas de *Maytenus rigida* obtidos a partir dos ensaios de planejamento fatorial.

Ensaio	Conc.	EtOH/ H ₂ O	Tempo	FT (mg EAT/g)	TAN (mg EAT/g)	FLA (mg ER/g)	CUM (mg EC/g)
1	-1	-1	-1	345,27 $\pm$ 10,67 ab	328,77 $\pm$ 12,24 a	30,82 $\pm$ 5,89 ac	50,90 $\pm$ 3,43 ac
2	1	-1	-1	365,26 $\pm$ 3,01 a	291,58 $\pm$ 7,69 ac	23,83 $\pm$ 5,93 a	50,90 $\pm$ 1,21 ac
3	-1	1	-1	327,32 $\pm$ 12,02 bc	248,95 $\pm$ 14,58 bd	41,79 $\pm$ 3,08 abc	93,17 $\pm$ 3,24 b
4	1	1	-1	348,08 $\pm$ 4,54 ac	264,21 $\pm$ 1,21 bcd	97,32 $\pm$ 11,02 b	104,46 $\pm$ 3,03 b
5	-1	-1	1	362,13 $\pm$ 8,65 a	283,31 $\pm$ 4,16 acd	77,61 $\pm$ 10,63 bcd	71,04 $\pm$ 1,82 ab
6	1	-1	1	351,21 $\pm$ 9,14 ac	280,23 $\pm$ 7,01 ac	46,94 $\pm$ 9,02 ab	60,61 $\pm$ 2,62 abd
7	-1	1	1	345,59 $\pm$ 9,93 acd	265,69 $\pm$ 8,48 bcd	50,23 $\pm$ 4,81 ab	49,61 $\pm$ 3,03 ac
8	1	1	1	338,46 $\pm$ 7,89 acd	263,33 $\pm$ 7,52 bcd	71,24 $\pm$ 6,54 bc	70,18 $\pm$ 7,88 ab
9*	0	0	0	312,83 $\pm$ 2,08 bd	233,70 $\pm$ 6,75 b	26,16 $\pm$ 1,53 ad	37,62 $\pm$ 1,54 c
10*	0	0	0	351,08 $\pm$ 6,61 ac	278,12 $\pm$ 4,90 ad	26,20 $\pm$ 3,01 ad	45,76 $\pm$ 2,27 cd
11*	0	0	0	347,33 $\pm$ 5,97 ac	262,72 $\pm$ 0,69 bcd	30,33 $\pm$ 0,35 ab	55,40 $\pm$ 6,36 abc

Legenda: FT = Fenóis Totais, TAN = Taninos, FLA = Flavonoides, CUM = Cumarinas, * = ponto central em triplicata. Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme Kruskal Wallis (seguido de Dunn), $p < 0.05$.

Os diagramas de Pareto apresentados na figura 11 indicam que, nas condições estudadas, a concentração, o tempo de extração e o teor alcóolico não apresentaram efeitos significativos sobre o teor de fenóis totais e taninos. Para flavonoides, o aumento do teor alcóolico e da concentração exerceram um efeito positivo, sendo o teor alcóolico o fator mais significativo estatisticamente e, portanto, o que mais favoreceu ao processo extrativo. A interação entre os fatores não foi significativa. No caso das cumarinas, o fator que apresentou efeito relevante foi o teor alcóolico, contribuindo para um aumento na extração deste metabólito.

Estas conclusões podem ser feitas a partir da linha tracejada vertical do diagrama, que indica o valor mínimo para que se observe a significância estatística, sendo o efeito mais expressivo quanto mais à direita dessa linha ele estiver (MARQUES, 2011).

Na figura 12 estão representados os diagramas dos extratos obtidos por cascas, onde as condições extrativas não exerceram efeitos significativos sobre os teores de fenóis totais, taninos e cumarinas. No que diz respeito aos teores de flavonoides, apenas a interação entre os três fatores não foi relevante, sendo a interação entre a concentração e teor alcóolico a mais significativa estatisticamente, interferindo de maneira mais expressiva no processo extrativo.

Em ambos os casos, o teor alcóolico interferiu no teor de flavonoides, o que corrobora com os estudos de Peixoto (2012), onde foi possível observar que o aumento da proporção de etanol resultou na redução da constante dielétrica favorecendo a solubilidade de metabólitos de média polaridade, além de que o aumento da concentração de água pode provocar a hidrólise destes compostos.

Assim como os flavonoides, as cumarinas são consideradas compostos de média polaridade (KUSTER; ROCHA, 2004), desta forma o aumento do teor alcóolico favoreceu maiores níveis nos extratos.

Quanto à proporção massa/ volume, observou-se que com o aumento da relação houve aumento do teor de flavonoides, indicando que não houve saturação do solvente.

Figura 11 - Diagramas de Pareto dos efeitos padronizados na extração das folhas de *Maytenus rigida* a partir do planejamento fatorial 2^3 .

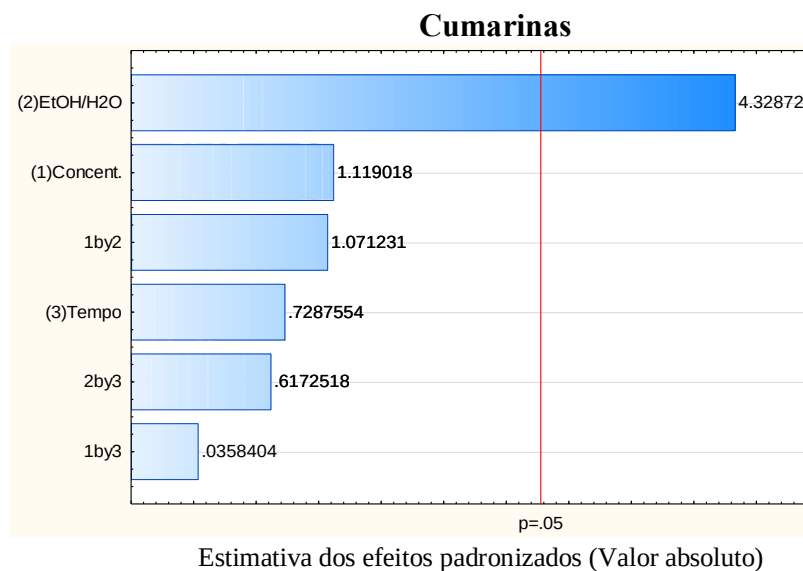
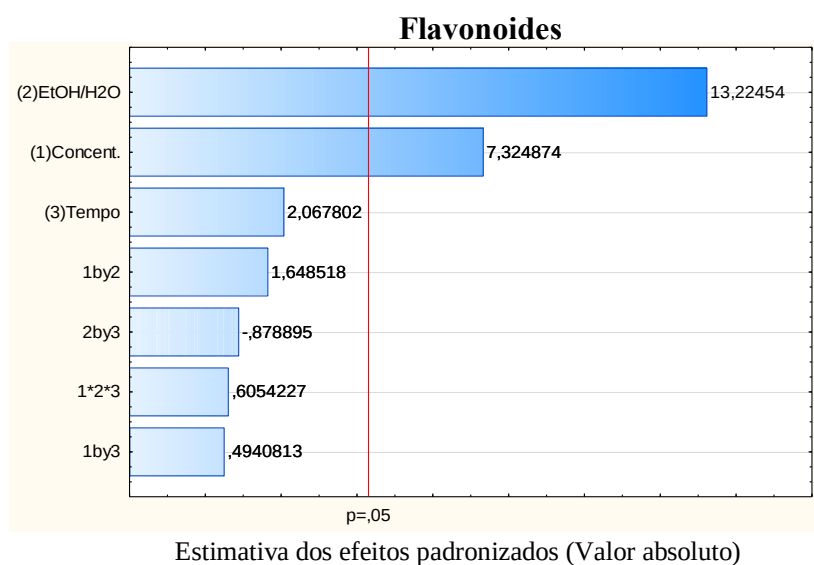
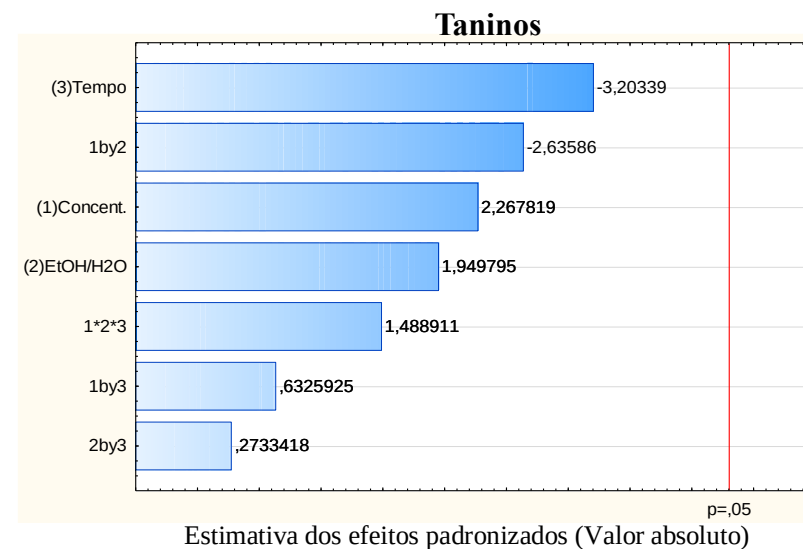
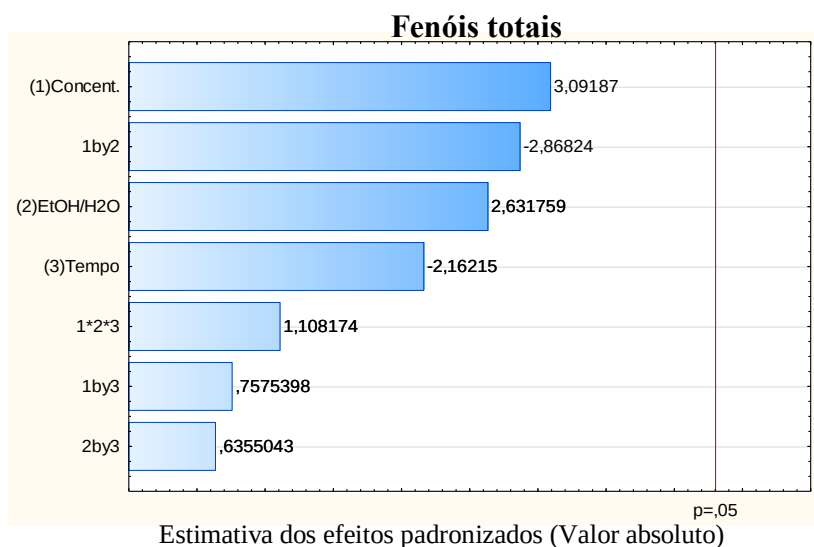
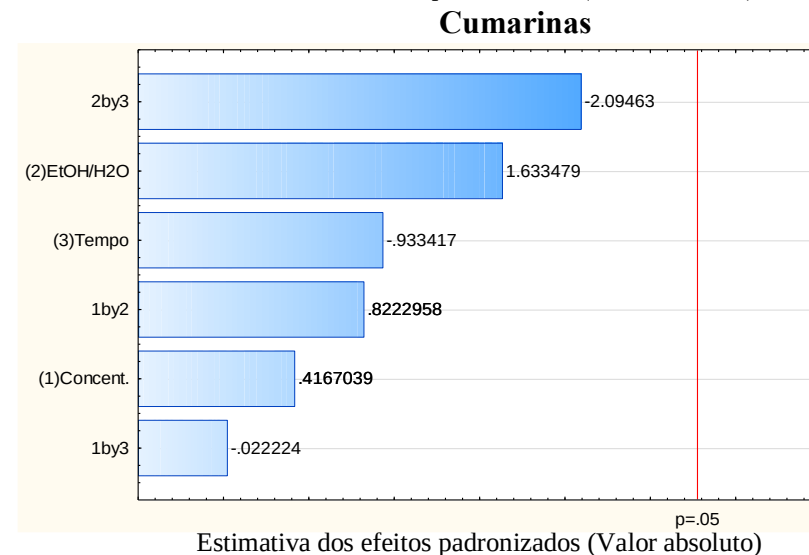
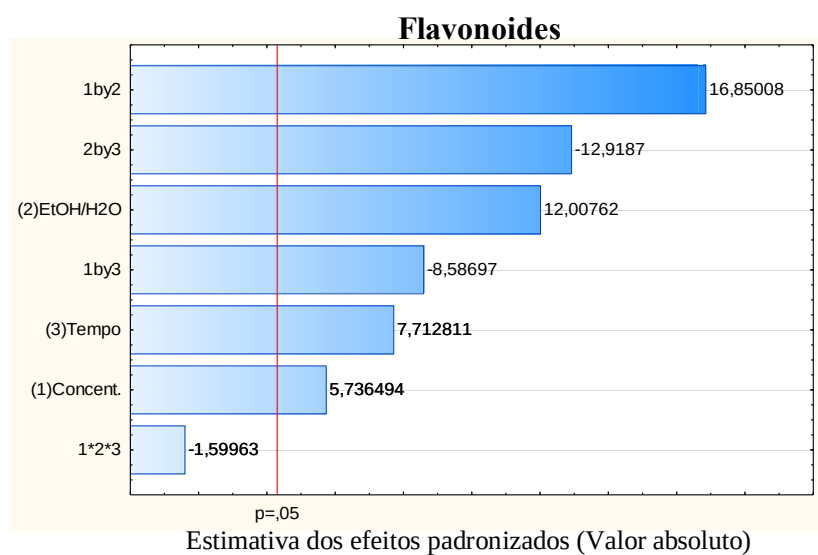
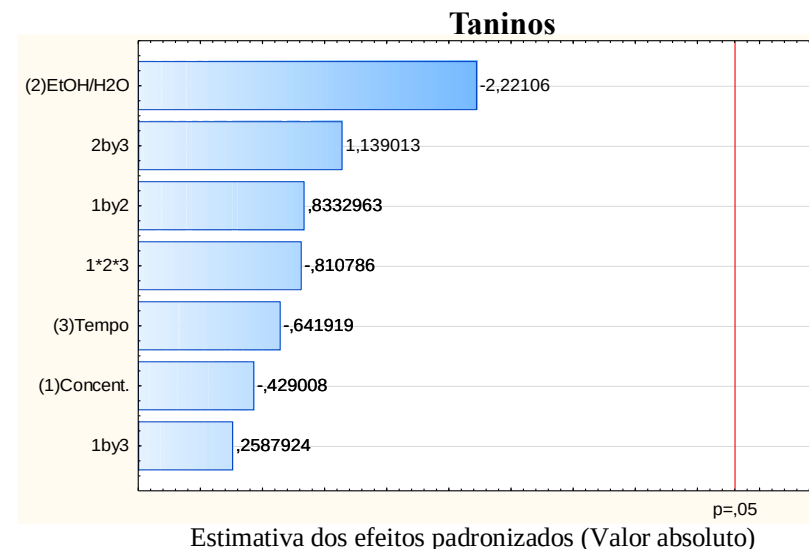
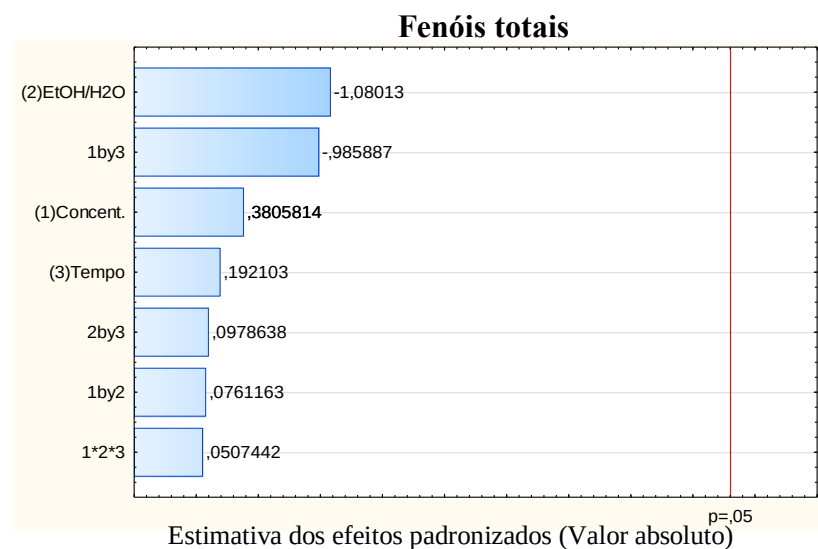


Figura 12 - Diagramas de Pareto dos efeitos padronizados na extração das cascas de *Maytenus rigida* a partir do planejamento fatorial 2^3 .



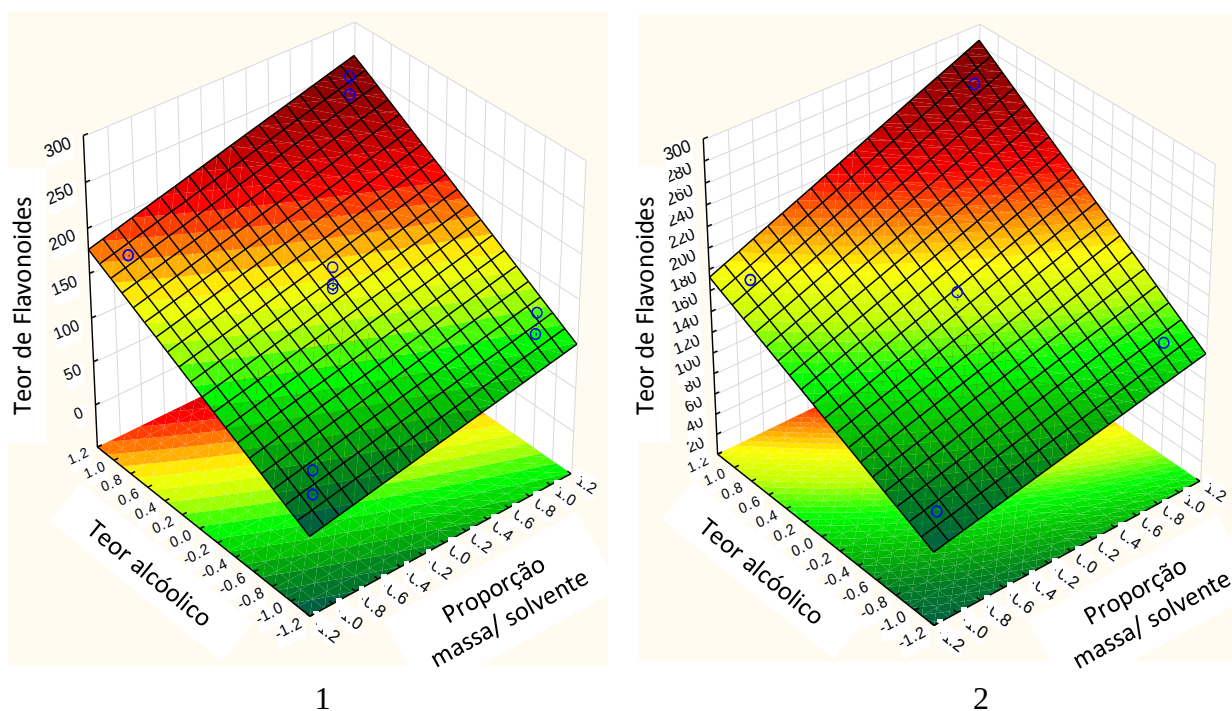
Os gráficos de Superfície de Resposta (figuras 13 e 14) permitiram uma melhor visualização dos efeitos e interações das variáveis nos extratos de folhas, afirmando o efeito positivo que o teor alcóolico e a concentração exerceram. Os resultados para a avaliação da significância do modelo de regressão encontram-se na tabela 10 e os valores de R^2 obtidos para fenóis totais (0,9453), taninos (0,9533), flavonoides (0,9916) e cumarinas (0,9815), por estarem próximos a 1, confirmaram a adequação do modelo.

Tabela 10 – Análise de variância para o modelo quadrático de superfície de resposta obtido a partir do planejamento fatorial 2^3 para os extratos de folhas de *Maytenus rigida*.

	SS	df	MS	F
Fenóis totais	167,6764	2	83,8382	4,32090
Taninos	141,4469	2	70,7234	5,10794
Flavonoides	313,0104	2	156,5052	29,63481
Cumarinas	33,9924	2	16,9962	13,32348

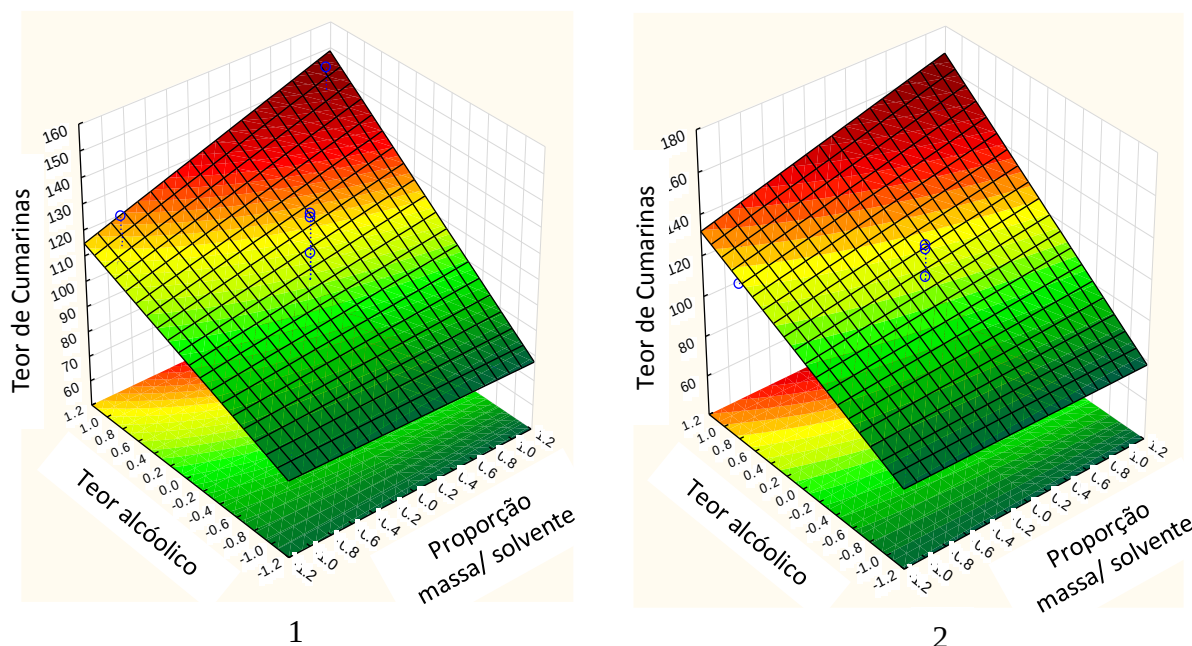
Legenda: SS = soma dos quadrados; df = grau de liberdade; MS = média dos quadrados.

Figura 13 – Gráfico de Superfície de Resposta dos teores de flavonoides dos extratos de folhas de *Maytenus rigida* obtidos pelo planejamento fatorial 2^3 .



Fonte: Autor. Legenda - Gráfico 1: tempo de extração - 15 min. Gráfico 2: tempo de extração - 45 min. O grau de significância de cada efeito é visualizado pela inclinação da reta. (Verde – piores condições, marrom – melhores condições).

Figura 14 – Gráfico de Superfície de Resposta dos teores de cumarinas dos extratos de folhas de *Maytenus rigida* obtidos pelo planejamento fatorial 2^3 .



Fonte: Autor. Legenda - Gráfico 1: tempo de extração - 15 min. Gráfico 2: tempo de extração - 45 min. O grau de significância de cada efeito é visualizado pela inclinação da reta. (Verde – piores condições, marrom – melhores condições).

Na figura 15 estão expressos os resultados de Superfície de Resposta dos extratos das cascas de *Maytenus rigida* que confirmam o efeito positivo causado pela interação entre a concentração e o teor alcóolico. Além de evidenciar efeitos positivos isolados, como a aumento da proporção de etanol e do tempo de extração. Os resultados para a avaliação da significância do modelo de regressão encontram-se na tabela 11 e os valores de R^2 obtidos para flavonoides (0,9980) e cumarinas (0,9624) confirmaram a adequação do planejamento para estas classes de metabólitos.

Tabela 11 – Análise de variância para o modelo quadrático de superfície de resposta obtido a partir do planejamento fatorial 2^3 para os extratos de cascas de *Maytenus rigida*.

	SS	df	MS	F
Fenóis totais	829,226	2	444,6130	0,3643
Taninos	1017,725	2	508,8626	1,2467
Flavonoides	11,482	2	5,7412	131,1440
Cumarinas	39,613	2	19,8063	6,4101

Legenda: SS = soma dos quadrados; df = grau de liberdade; MS = média dos quadrados.

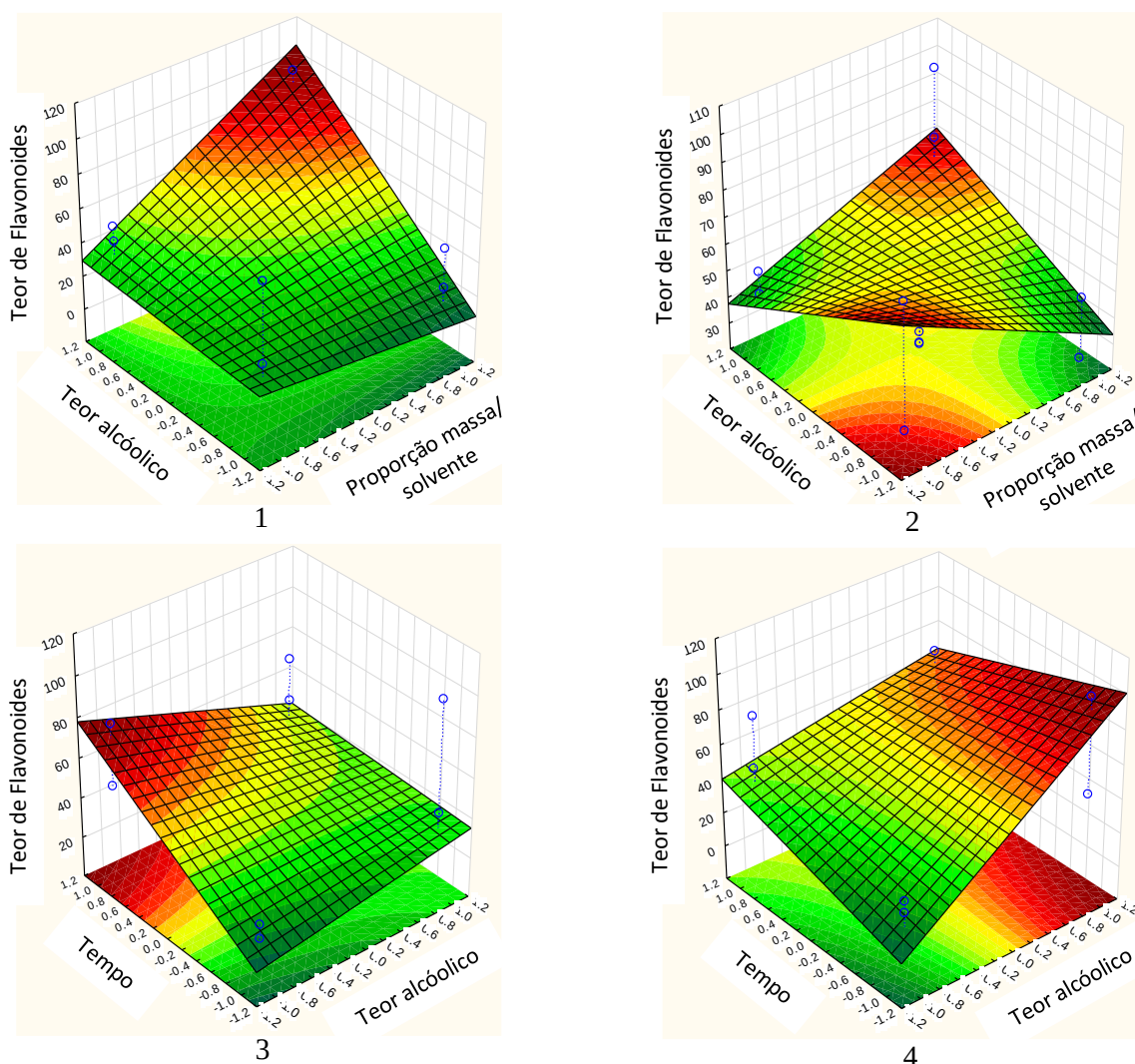
Porém para os demais compostos o valor não foi satisfatório (fenóis totais = 0,5930; taninos = 0,8329), sendo necessário alguns ajustes para que descreva de maneira mais adequada as interações entre as variáveis escolhidas. A interação entre os fatores analisados e a influência

nos teores de fenóis totais podem ser observadas nos gráficos de Superfície de Resposta dispostos na figura 16.

Um dos possíveis pontos de ajuste seria o tempo de extração, pois devido a rigidez das cascas a duração da extração não deve ter sido suficiente para retirada de compostos mais complexos e majoritários na planta, como fenóis totais e taninos, facilitando apenas a retirada de moléculas menores como os flavonoides.

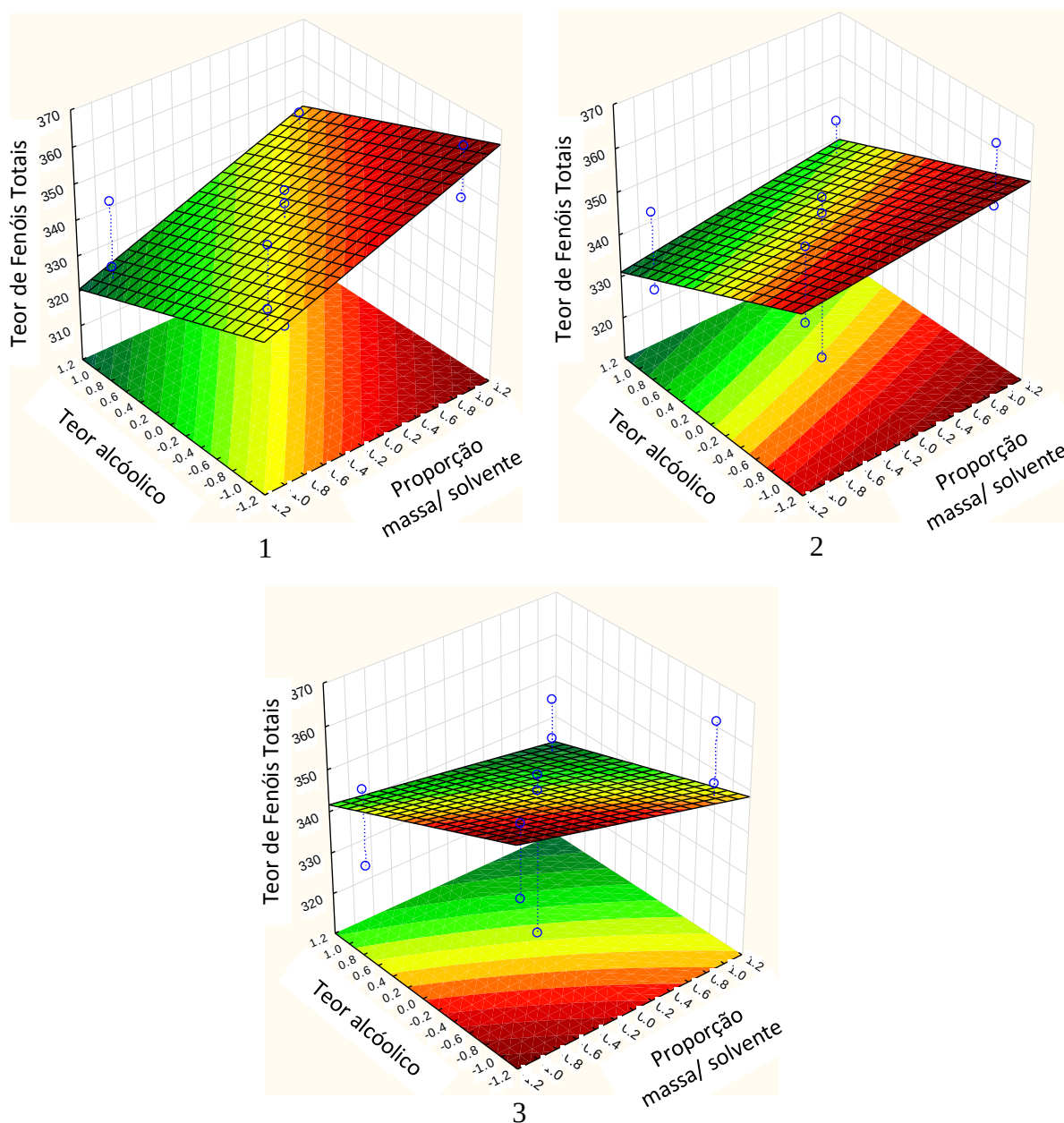
Segundo Lima e colaboradores (2015), o teor de compostos fenólicos é diretamente proporcional ao tempo de extração, indicando que um maior tempo de preparo pode levar aumentar a retirada destes metabólitos, o mesmo foi observado por outros estudos que afirmaram a influência do tempo na extração de polifenóis e na atividade que desempenham (ASTIL et al., 2001; CHEN et al., 2001).

Figura 15 – Gráficos de Superfície de Resposta dos teores de flavonoides dos extratos de cascas de *Maytenus rigida* obtidos pelo planejamento fatorial 2^3 .



Fonte: Autor. Legenda - Gráfico 1: tempo de extração - 15 min. Gráfico 2: tempo de extração - 60 min. Gráfico 3: proporção 1/20. Gráfico 4: proporção 1/5. O grau de significância de cada efeito é visualizado pela inclinação da reta. (Verde – piores condições, marrom – melhores condições).

Figura 16 – Gráficos de Superfície de Resposta dos teores de fenóis totais dos extratos de cascas de *Maytenus rigida* obtidos pelo planejamento fatorial 2^3 .



Fonte: Autor. Legenda - Gráfico 1: tempo de extração - 15 min. Gráfico 2: tempo de extração - 30 min. Gráfico 3: tempo de extração - 60 min. O grau de significância de cada efeito é visualizado pela inclinação da reta. (Verde – piores condições, marrom – melhores condições).

Os extratos foram também submetidos a testes antimicrobianos para avaliar se a variação da composição dos extratos influencia na atividade. Os resultados encontram-se nas tabelas 12 e 13. Os extratos permaneceram com a classificação de ativos para *S. aureus* e *M. luteus*, e parcialmente ativos em relação a *E. faecales*.

Tabela 12 - Atividade antimicrobiana (halos de inibição em mm $\pm$ desvio padrão) dos extratos hidroalcoólicos de folhas de *Maytenus rigida* obtidos a partir do planejamento fatorial 2^3 .

Condições				Microrganismos				
Ensaio	Conc.	EtOH/ H ₂ O	Tempo	<i>S. aureus</i> (UFPEDA 01)	<i>M. luteus</i> (UFPEDA 06)	<i>B. subtilis</i> (UFPEDA 16)	<i>E. faecalis</i> (UFPEDA 138)	<i>S. marcescens</i> (UFPEDA 398)
1	-1	-1	-1	13,0 $\pm$ 0,0	14,7 $\pm$ 0,6	-	9,7 $\pm$ 0,6	-
2	1	-1	-1	13,0 $\pm$ 0,0	14,3 $\pm$ 1,2	-	9,6 $\pm$ 0,6	-
3	-1	1	-1	13,0 $\pm$ 0,0	14,3 $\pm$ 1,2	-	9,0 $\pm$ 0,0	-
4	1	1	-1	13,3 $\pm$ 0,6	15,0 $\pm$ 0,0	-	10,0 $\pm$ 0,0	-
5	-1	-1	1	13,0 $\pm$ 0,0	15,0 $\pm$ 0,0	-	9,7 $\pm$ 1,2	-
6	1	-1	1	12,7 $\pm$ 0,6	14,7 $\pm$ 0,6	-	11,3 $\pm$ 0,6	-
7	-1	1	1	13,3 $\pm$ 0,6	16,3 $\pm$ 0,6	-	10,3 $\pm$ 1,2	-
8	1	1	1	14,3 $\pm$ 1,2	15,3 $\pm$ 0,6	-	9,7 $\pm$ 1,2	-
9*	0	0	0	14,0 $\pm$ 0,0	15,3 $\pm$ 0,6	-	11,0 $\pm$ 1,7	-
10*	0	0	0	13,3 $\pm$ 0,6	15,0 $\pm$ 0,0	-	9,3 $\pm$ 0,6	-
11*	0	0	0	13,7 $\pm$ 0,6	15,0 $\pm$ 0,0	-	10,7 $\pm$ 0,6	-

Legenda: (-) = sem atividade, (*) = ponto central em triplicata.

Tabela 13 - Atividade antimicrobiana (halos de inibição em mm $\pm$ desvio padrão) dos extratos hidroalcoólicos de cascas de *Maytenus rigida* obtidos a partir do planejamento fatorial 2^3 .

Condições				Microrganismos				
Ensaio	Conc.	EtOH/ H ₂ O	Tempo	<i>S. aureus</i> (UFPEDA 01)	<i>M. luteus</i> (UFPEDA 06)	<i>B. subtilis</i> (UFPEDA 16)	<i>E. faecalis</i> (UFPEDA 138)	<i>S. marcescens</i> (UFPEDA 398)
1	-1	-1	-1	13,3 $\pm$ 0,6	17,3 $\pm$ 0,6	-	12,0 $\pm$ 0,0	-
2	1	-1	-1	13,0 $\pm$ 0,0	18,0 $\pm$ 0,0	-	11,3 $\pm$ 0,6	-
3	-1	1	-1	12,7 $\pm$ 0,6	16,7 $\pm$ 1,5	-	11,7 $\pm$ 0,6	-
4	1	1	-1	13,0 $\pm$ 1,0	16,3 $\pm$ 0,6	-	11,7 $\pm$ 0,6	-
5	-1	-1	1	13,3 $\pm$ 0,6	17,0 $\pm$ 0,0	-	11,3 $\pm$ 0,6	-
6	1	-1	1	13,3 $\pm$ 0,6	16,7 $\pm$ 2,3	-	12,3 $\pm$ 0,6	-
7	-1	1	1	13,7 $\pm$ 0,6	18,3 $\pm$ 0,6	-	11,3 $\pm$ 0,6	-
8	1	1	1	13,0 $\pm$ 0,0	16,0 $\pm$ 1,0	-	11,7 $\pm$ 0,6	-
9*	0	0	0	13,3 $\pm$ 0,6	17,0 $\pm$ 0,0	-	12,0 $\pm$ 1,0	-
10*	0	0	0	13,3 $\pm$ 0,6	16,7 $\pm$ 0,6	-	11,7 $\pm$ 0,6	-
11*	0	0	0	14,0 $\pm$ 0,0	17,0 $\pm$ 1,0	-	12,3 $\pm$ 0,6	-

Legenda: (-) = sem atividade, (*) = ponto central em triplicata.

Nas condições estudadas, os halos de inibição para *S. aureus* e *E. faecales* não sofreram influência significativa. Porém, em relação a atividade frente a *M. luteus*, nos extratos de folhas, o aumento do tempo de extração apresentou efeito positivo na inibição. Para este mesmo microrganismo, nos extratos de cascas, apenas a interação entre o teor alcóolico e o tempo de extração exerceu efeito positivo significativo. Estas análises são visíveis nos diagramas de Pareto presentes nas figuras 17 e 18.

No que diz respeito à relação entre a composição química e a atividade antimicrobiana, nos extratos de folhas, houve correlação positiva entre o teor de flavonoides e a inibição de *S. aureus* ($r_s = 0,6576$, $p = 0,0278$); e entre o teor de cumarinas e a ação frente à *S. aureus* ($r_s = 0,7845$, $p = 0,0042$) e *M. luteus* ($r_s = 0,6045$, $p = 0,0488$). Nos extratos de cascas não houve correlação entre os compostos fenólicos analisados e a atividade.

A adequação do modelo para a ação antimicrobiana de folhas e cascas de *Maytenus rigida* frente a *M. luteus* foi confirmada pelos valores de R^2 , 0,9762 e 0,9842, respectivamente.

Os compostos que obtiveram maiores teores não apresentaram correlação com a atividade estudada, sugerindo que esta ação seja proveniente de um sinergismo entre os metabólitos. Segundo Silveira (1997), os extratos vegetais apresentam uma mistura de compostos biologicamente ativos que atuam sinergicamente na permeabilidade da membrana ou na respiração celular microbiana, levando à morte ou inibição de crescimento.

Figura 17 - Diagramas de Pareto dos efeitos padronizados na atividade antimicrobiana dos extratos das folhas de *Maytenus rigida* a partir do planejamento fatorial 2^3 .

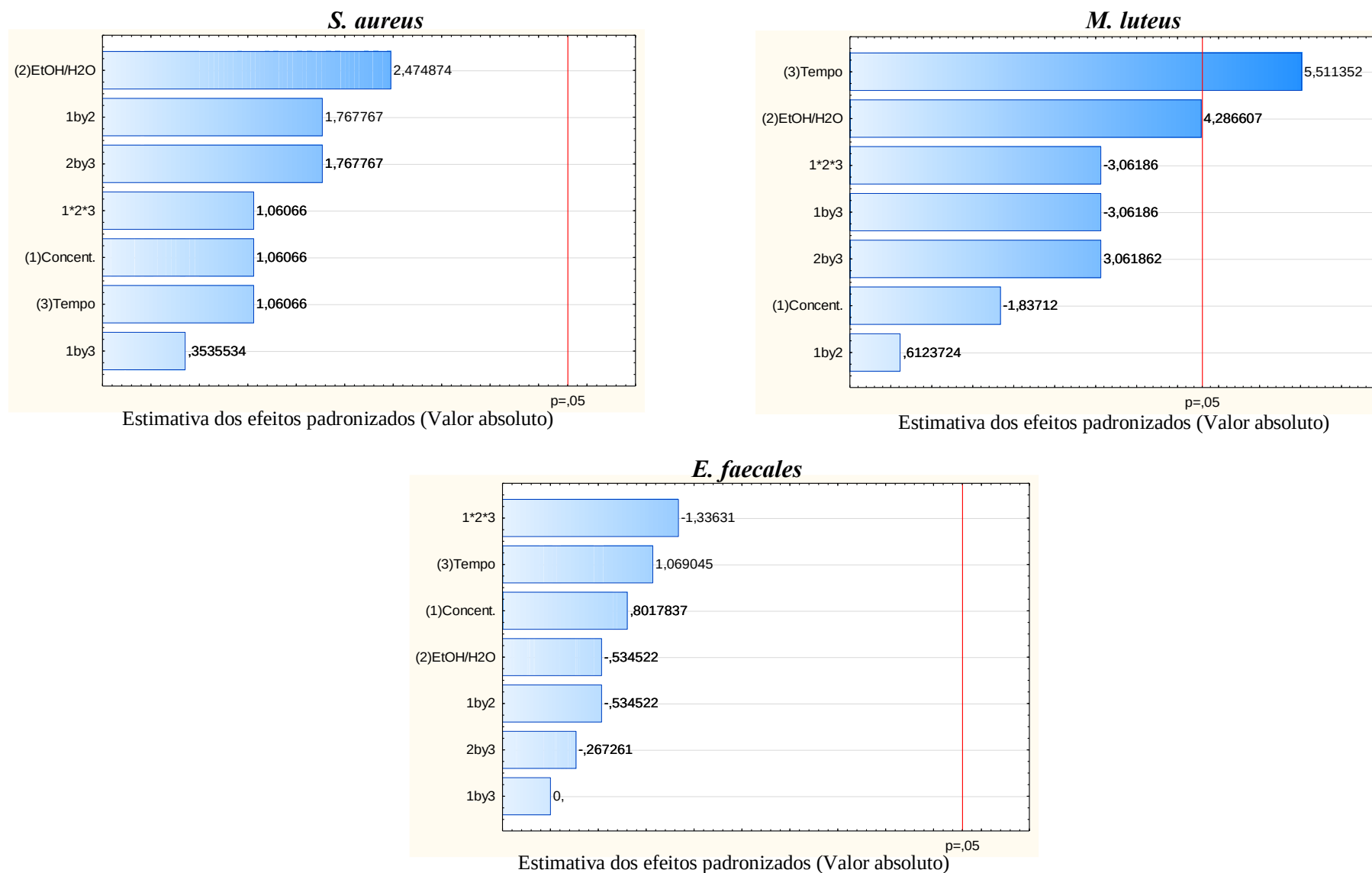
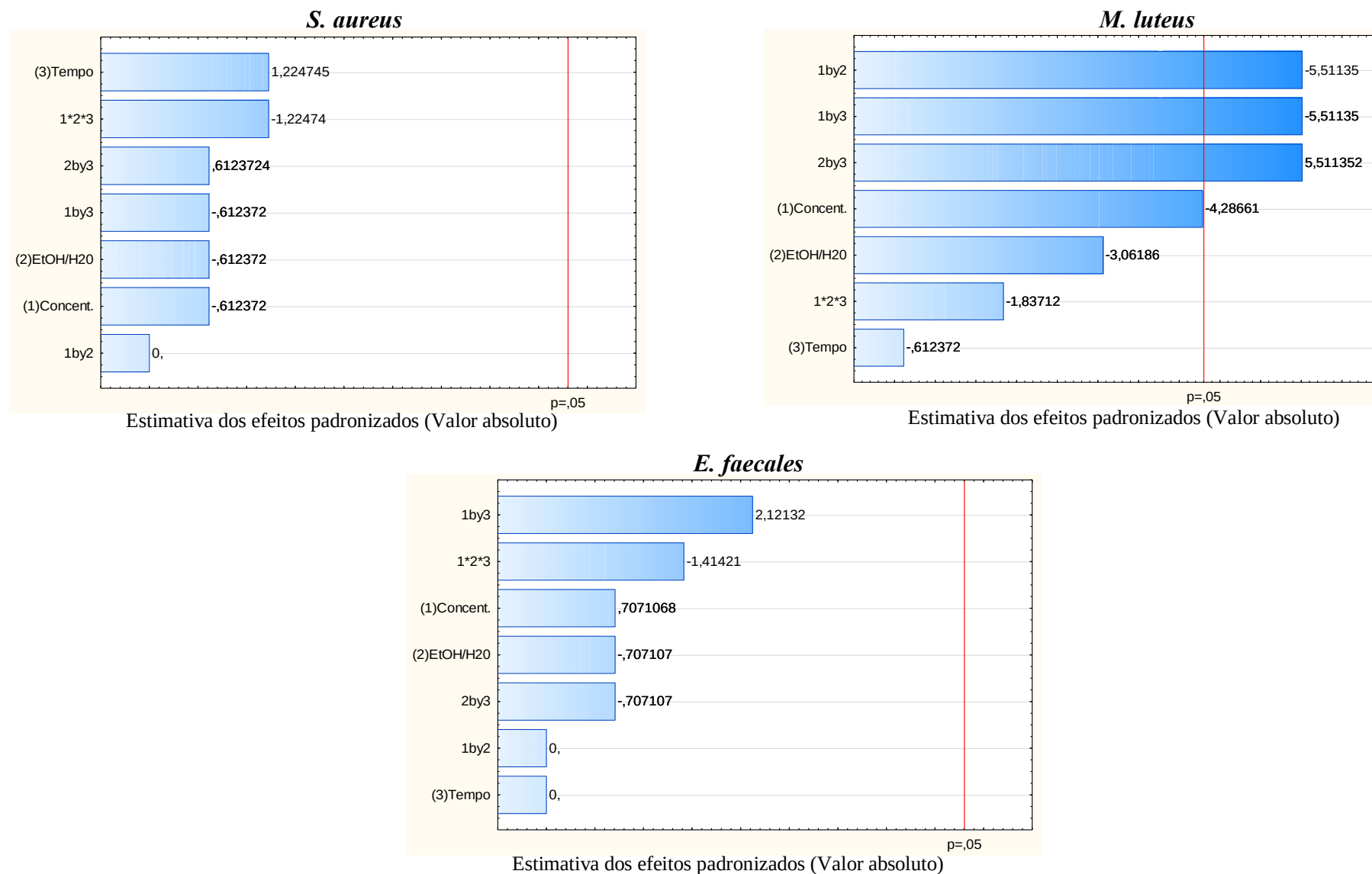


Figura 18 - Diagramas de Pareto dos efeitos padronizados na atividade antimicrobiana dos extratos das cascas de *Maytenus rigida* a partir do planejamento fatorial 2^3 .



5.4. Atividade antimicrobiana frente a isolados clínicos

Os extratos foram testados frente a cinco cepas de isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* provenientes da biblioteca de microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE, e os resultados obtidos estão descritos nas tabelas 14 e 15.

Não houve diferença significativa na inibição dos microrganismos pelos extratos de folhas e cascas, no geral, observou-se halos de inibição na faixa dos 12-15 mm, sendo todos considerados ativos.

Os resultados corroboram com os testes de Santos e colaboradores (2011), onde os extratos etanólicos de bom-nome e a fração acetato de etila mostraram-se ativos frente a cepas de *S. aureus* isolados de paciente com infecções nosocomiais. Neste estudo, também observou-se que os extratos de *Maytenus rigida* apresentam apenas ação frente a bactérias Gram-positivas.

No que concerne a relação entre a atividade e os compostos analisados, não houve correlação positiva entre os metabólitos analisados e a atividade frente às cepas de isolados clínicos de *S. aureus*, sugerindo, como dito anteriormente, que a ação antimicrobiana pode estar relacionada ao sinergismo entre os compostos e não a um grupo de metabólitos específico.

Diante destes resultados, *Maytenus rigida* torna-se uma espécie promissora para desenvolvimento de antimicrobianos, pois os extratos brutos apresentaram ação frente a microrganismos resistentes aos medicamentos utilizados como padrão, destacando a ação frente às cepas 728 e 732, onde não foi possível a inibição do crescimento nem com Eritromicina, que é um macrolídeo utilizado para infecções por cocos Gram-positivos (BRUNTON, 2010); nem com Oxacilina, fármaco da classe das penicilinas, utilizado para infecções causadas por *S. aureus* resistentes à meticilina (BRUNTON, 2010a).

Tabela 14 - Atividade antimicrobiana (halos de inibição em mm $\pm$ desvio padrão) dos extratos hidroalcoólicos de folhas de bom-nome frente a isolados clínicos de *S. aureus*.

Condições				Microrganismos				
Ensaio	Conc.	EtOH/ H ₂ O	Tempo	<i>S. aureus</i> Secreção de úlcera (UFPEDA 700)	<i>S. aureus</i> Ponta de cateter (UFPEDA 725)	<i>S. aureus</i> Orofaringe (UFPEDA 728)	<i>S. aureus</i> Ferida operatória (UFPEDA 731)	<i>S. aureus</i> Fragmento ósseo (UFPEDA 732)
1	-1	-1	-1	12,7 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 0,6	11,7 $\pm$ 1,2	13,3 $\pm$ 1,5	12,0 $\pm$ 0,0
2	1	-1	-1	12,3 $\pm$ 0,6	14,0 $\pm$ 0,0	13,3 $\pm$ 0,6	12,3 $\pm$ 0,6	12,6 $\pm$ 0,6
3	-1	1	-1	12,0 $\pm$ 0,0	12,3 $\pm$ 0,6	12,0 $\pm$ 0,0	13,0 $\pm$ 1,0	12,3 $\pm$ 1,5
4	1	1	-1	12,7 $\pm$ 0,6	13,0 $\pm$ 1,0	12,7 $\pm$ 0,6	12,7 $\pm$ 0,6	12,3 $\pm$ 0,6
5	-1	-1	1	12,0 $\pm$ 0,0	13,0 $\pm$ 1,0	12,7 $\pm$ 0,6	13,7 $\pm$ 0,6	13,0 $\pm$ 1,0
6	1	-1	1	12,3 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 0,6	12,3 $\pm$ 0,6	14,0 $\pm$ 1,0
7	-1	1	1	12,3 $\pm$ 0,6	12,6 $\pm$ 0,6	12,3 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 0,6	12,6 $\pm$ 0,6
8	1	1	1	12,3 $\pm$ 0,6	12,7 $\pm$ 1,2	13,3 $\pm$ 0,6	13,0 $\pm$ 0,0	13,3 $\pm$ 0,6
9*	0	0	0	12,7 $\pm$ 0,6	14,7 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 0,6	15,0 $\pm$ 0,0	15,0 $\pm$ 1,0
10*	0	0	0	13,0 $\pm$ 0,0	13,7 $\pm$ 1,2	13,0 $\pm$ 1,0	14,3 $\pm$ 0,6	15,0 $\pm$ 1,0
11*	0	0	0	12,7 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 0,6	12,7 $\pm$ 1,2	13,0 $\pm$ 1,0	14,0 $\pm$ 1,0
Padrões								
Eritromicina				0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Oxacilina				18,0 $\pm$ 0,0	20,0 $\pm$ 0,0	0,0	22,0 $\pm$ 0,0	0,0

Legenda: (*) = ponto central em triplicata.

Tabela 15 - Atividade antimicrobiana (halos de inibição em mm $\pm$ desvio padrão) dos extratos hidroalcoólicos de cascas de bom-nome frente a isolados clínicos de *S. aureus*.

Condições				Microrganismos				
Ensaio	Conc.	EtOH/ H ₂ O	Tempo	<i>S. aureus</i> Secreção de úlcera (UFPEDA 700)	<i>S. aureus</i> Ponta de cateter (UFPEDA 725)	<i>S. aureus</i> Orofaringe (UFPEDA 728)	<i>S. aureus</i> Ferida operatória (UFPEDA 731)	<i>S. aureus</i> Fragmento ósseo (UFPEDA 732)
1	-1	-1	-1	12,3 $\pm$ 0,6	15,7 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 1,2	14,0 $\pm$ 1,0	14,0 $\pm$ 1,0
2	1	-1	-1	12,7 $\pm$ 0,6	14,3 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 0,6	14,3 $\pm$ 1,2	14,3 $\pm$ 0,6
3	-1	1	-1	12,3 $\pm$ 1,2	14,0 $\pm$ 1,0	12,7 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 0,6	13,0 $\pm$ 0,0
4	1	1	-1	11,7 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 0,6	12,3 $\pm$ 0,6	13,7 $\pm$ 0,6
5	-1	-1	1	12,3 $\pm$ 0,6	13,7 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 0,6	13,0 $\pm$ 1,0	14,3 $\pm$ 0,6
6	1	-1	1	13,0 $\pm$ 1,0	14,0 $\pm$ 1,0	14,7 $\pm$ 0,6	15,3 $\pm$ 0,6	13,7 $\pm$ 0,6
7	-1	1	1	12,0 $\pm$ 1,0	13,3 $\pm$ 0,6	13,7 $\pm$ 0,6	13,7 $\pm$ 0,6	13,7 $\pm$ 0,6
8	1	1	1	11,7 $\pm$ 0,6	13,7 $\pm$ 0,6	12,7 $\pm$ 0,6	13,7 $\pm$ 1,2	14,0 $\pm$ 1,0
9*	0	0	0	12,7 $\pm$ 0,6	13,7 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 0,6	13,0 $\pm$ 1,0	14,0 $\pm$ 0,0
10*	0	0	0	12,0 $\pm$ 1,0	13,0 $\pm$ 1,0	13,0 $\pm$ 1,0	13,3 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 0,6
11*	0	0	0	12,7 $\pm$ 0,6	14,3 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 1,2	12,3 $\pm$ 0,6	13,7 $\pm$ 1,2
Padrão								
Eritromicina				0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Oxacilina				18,0 $\pm$ 0,0	20,0 $\pm$ 0,0	0,0	22,0 $\pm$ 0,0	0,0

Legenda: (*) = ponto central em triplicata.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho mostrou que entre os métodos extrativos analisados, a extração por decocção sob refluxo mostrou-se a mais adequada para extração de compostos fenólicos, apesar de não mostrar diferença significativa dos teores obtidos nos processos de remaceração e a extração por micro-ondas.

Também foi possível observar que os fatores analisados, tempo de extração, proporção massa/ solvente e teor alcóolico, influenciam na extração dos compostos fenólicos de *Maytenus rigida*, evidenciando para os extratos de folhas a influência do aumento do teor alcóolico que favoreceu a retirada dos flavonoides e cumarinas. Em relação aos extratos obtidos das cascas, a interação entre teor alcóolico e a proporção massa/ solvente foi a mais relevante para a extração de flavonoides.

No que diz respeito à atividade analisada, as condições extrativas interferiram apenas na ação frente a *M. luteus*, quanto aos demais microrganismos, não houve diferença significativa entre os halos de inibição obtidos.

Diante deste contexto, levando em consideração que não houve influência significativa nos teores de fenóis totais e taninos e analisando os teores de flavonoides e cumarinas, as condições que favoreceram níveis mais elevados de compostos fenólicos para os extratos obtidos por folhas foram proporção 1/5, teor alcoólico 92,8% e tempo de 45 minutos. Nos extratos obtidos por cascas, as condições extrativas mais favoráveis foram proporção 1/5, teor alcoólico 92,8% e tempo de 15 minutos.

Dentro dos níveis e variáveis analisadas, os teores de fenóis totais e taninos, tanto nas cascas quanto nas folhas, não sofreram interferência, mostrando que independente do método extrativo utilizado ou das condições de extração, estes metabólitos conseguem ser obtidos em quantidade significativa. O mesmo pode ser observado em relação a atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* e *E. faecales*. Vale salientar que isso é aplicável a *Maytenus rigida*, outras amostras vegetais podem reagir de maneira diferente.

Os resultados encontrados na atividade antimicrobiana, principalmente nos testes com cepas de isolados clínicos, demonstraram que os extratos de bom-nome apresentam potencial para fornecer substâncias com atividade antimicrobiana, exercendo ação frente a bactérias Gram-positivas.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. J. S. et al. Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L. **European Journal of Integrative Medicine**. v. 7, p. 151-156, 2015.
- ALBUQUERQUE, U.P. et al. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**. v.114, p.325-354, 2007.
- ALINIAN, S.; RAZMJOO, J. ZEINALI, H. Flavonoids, anthocynins, phenolics and essential oil produced in cumin (*Cuminum cyminum* L.) accessions under different irrigation regimes. **Industrial Crops and Products**. v. 81, p. 49-55, 2016.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. Ferramentas químicas aplicadas aos estudos etnobotânicos. In: ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P.; CUNHA, L. V. F. C. **Métodos e técnicas na pesquisa etnobiológica e etnoecológica**. Recife/PE: NUPPEA, 2010. Cap. 23, p. 501-526.
- ALÓS, J. I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 33, n. 10, p. 692-699, 2015.
- ALVES, T. M. A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 95, n. 3, p. 367-373. 2000.
- AMORIM, E. L. C. et al. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystems and Communities**. v. 2, n. 1, p. 88-94, 2008.
- ANGELO, P. M.; JORGE, M. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ARAPITSAS, P. Hydrolyzable tannin analysis in food. **Food Chemistry**. v. 135, p. 1708-1717, 2012.
- ASTILL, C. et al. Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of blacks and green tea infusions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, n. 11, p. 5340-5347, 2001.
- ÁVILA, P. H. et al. Structure – activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. v. 16, p. 9790 – 9794, 2008.
- AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, 2007.
- AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**. v.117, p. 426-436, 2013.
- BAGGIO, C. H. et al. Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H⁺, K⁺ -ATPase activity and formation of nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 113, p. 433-440, 2007.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como variar tudo ao mesmo tempo. In: BARROS NETO, B. et al. **Como fazer experimentos: aplicações na ciência e na indústria**. 4ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. Cap. 3, p. 120-130.

- BARRY, A. L. **Procedure goes testing antimicrobial agents in Agar measures: theortical considerations**. Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore: Williams & Willians, 1986. p. 13.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alim. Nutr.** v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by the standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 45, n. 4, p. 493 - 496, 1966.
- BEHLING, E. B. et al. Flavonoide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.** v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BERNARDES, R. C.; JORGE, A. O. C.; LEÃO, M. V. P. Sensibilidade à oxacilina, vancomicina e teicoplanina de *Staphylococcus* coagulase-positivos isolados de pacientes hospitalizados em São José dos Campos. **Rev. biocênc.** v. 10, n. 1-2, p. 73-78, 2004.
- BONA, E. A. M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.81, n.3, p.218-225, 2014.
- BRUNTON, L. L. et al. Penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos betalactâmicos. In: BRUNTON, L. L. et al. **Goodman & Gilman: Manual de Farmacologia e Terapêutica**. 1ª Ed. Porto Alegre/RS: AMGH Editora, 2010a. Cap. 44, p. 728-750.
- BRUNTON, L. L. et al. Inibidores da síntese de proteínas e agentes antibacterianos diversos. In: BRUNTON, L. L. et al. **Goodman & Gilman: Manual de Farmacologia e Terapêutica**. 1ª Ed. Porto Alegre/RS: AMGH Editora, 2010. Cap. 46, p. 762-783.
- CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 2004. Cap. 20, p. 519-535.
- CARDOSO, F. L. et al. Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonoides e quinonas de extratos foliares de *Aloe arborescens* Mill., Xanthorrhoeaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, p. 35-40, 2010.
- CASTRO, H. G. et al. Rendimento de tanino em dois acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala*), em diferentes épocas de colheita em Viçosa-MG. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v. 1, n. 2, p. 29-33, 1999.
- CHEN, Z. et al. Degradation of green te catechins in tea drinks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, n. 1, p. 477-482, 2001.
- CNIP - CENTRO NORDESTINO DE INFORMAÇÕES SOBRE PLANTAS. Disponível em: <http://www.cnip.org.br>. Acesso em: 18 de Junho de 2015.
- COSTA, P. M. et al. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicology in Vitro**. v. 22, p. 854-863, 2008.
- COSTA, E. M. M. B. et al. *In vitro* antimicrobial activity of plant extracts of semi-arid region of Paraíba, PB, Brazil. **Revista Odonto Ciência**. v. 28, n. 4, 2013.

COUTINHO, H. D. M. et al. Fruits to potentiate the antibiotic activity: the effect of *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum* L. against MRSA. **Acta Alimentaria**. v. 41, n. 1, p. 67-72, 2012.

CUNICO, M. W. M. et al. Planejamento Fatorial: Uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**. v. 9, n.1, p. 23-32, 2009.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agentes. **Currente Opinion in Biotechnology**. v. 23, p. 174-181, 2012.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plan Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**. v. 15, p. 7313-7352, 2010.

DENG, Y. et al. Polyphenols, antioxidante and antimicrobial activities of leaf and bark extracts of *Solidago canadensis* L. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 803-809, 2015.

DIAS, K. S. et al. Antinociceptive activity of *Maytenus rigida* steam bark. **Fitoterapia**. v. 78, p. 460-464, 2007.

DUARTE, A. F. S. et al. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico bruto e frações orgânicas obtidas a partir da casca do caule da espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Schtdl. (Rubiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, p. 607-614, 2014.

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

ESQUENAZI, D. et al. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Res. Microbiol.** v.153, n. 10, p. 647-652, 2002.

ESTEVAM, C. S. et al. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, p. 299-303, Jan/Mar 2009.

ESTEVES, D. C. et al. Avaliação de conservação da viabilidade de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* sob influência de fluídos biológicos em superfícies secas. **Colloquium Vitae**. v. 6, n. 2, p. 31-42, 2014.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 2004. Cap. 10, p. 229-245.

FONSECA, P.; LIBRANDI, A. P. L. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 2, 2008.

FONSECA, S. G. C. A extração. In: FONSECA, S. G. C. **Farmacotécnica de Fitoterápicos**. Departamento de Farmácia – UFC, 2005. p. 9-24.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R.E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In WROLSTAD, R. E. (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: Wiley, 2001.

GHOSH, S.; FLORES, A. Common variance fractional factorial designs and their optimality to identify a class of models. **Journal of Statistical Planning and Inference**. v. 143, n. 10, p. 1807-1815, 2013.

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.

GROSSO, C. et al. Box-Behnken factorial design to obtain a phenolic-rich extract from the aerial parts of *Chelidonium majus* L. **Talanta**. v. 130, n. 1, p. 128-136, 2014.

HUIE, C. V. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 373, p. 23-30, 2002.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo Demográfico 2010. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>.

JOFFILY, A.; VIEIRA, R. C. Anatomia foliar de *Maytenus* Mol. emend Mol. (Celastraceae), ocorrente no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta botanica brasílica**. v. 19, n. 3, p. 549-561, 2005.

KONEMAN, E. W. et al., **Diagnóstico microbiológico**. México: J. B. Lippincott Co. 1997, p. 570.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 2004. Cap. 21, p. 537-575.

LIMA, A. P. Avaliação da atividade cicatrizante do extrato etanólico da casca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Scientia Plena**. v. 6, n. 3, 2010.

LIMA, B. S. et al. Development of standardized extractive solution from *Lippia sidoides* by factorial design and their redox active profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 25, n. 3, p. 301-306, 2015.

LIMA, C. et al. Extração de compostos antioxidantes da decocção do rizoma de gengibre, influência do tempo de preparo e do material vegetal. In: Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 20, Cruz Alta. *Anais...* Cruz Alta: Universidade de Cruz Alta, 2015.

LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antimicrobiana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**. v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

MA, L. et al. Optimization of extraction, preliminar characterization and hepatoprotective effects of polysaccharides from *Stachys floridiana* Schuttl. ex Benth. **Carbohydrates Polimers**, v. 87, n. 2, p. 1390-1398, 2012.

MARQUES, G. S. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Química Nova**. v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MARQUES, G. S. **Desenvolvimento e avaliação de metodologias analíticas para quantificação de flavonoides totais e caferitrina em folhas de *Bauhinia forficata* Link.** Recife: 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco.

MARQUES, L. C.; VIGO, C. L. S. Preparação e Padronização de Extratos Vegetais. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009. Cap. 7, p. 169-204.

MARTINS, M. V. et al. Antinociceptive effects of an extract, fraction and na isolated compound of the stem bark of *Maytenus rigida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 22, n. 3, p. 598-603, 2012.

MENDES, S. S. et al. Genotoxicity test of *Maytenus rigida* and *Aristolochia birostris* in the radicular meristem of the onion, *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. n. 22, v. 1, p. 76-81, 2012.

MIGLIATO, K. F. et al. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) skeels. **Química Nova**. v. 34, n. 4, p. 695-699, 2011.

MOLINARI, G. Natural Products in Drug Discovery: Present Status and Perspectives. **Pharmaceutical Biotechnology – Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 655, p. 13-27, 2009.

MONDAL, K. C.; BANERJEE, D.; JANA, M.; PATI, B. R. Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hydrolase activity. **Analytical Biochemistry**. v. 295, p. 168-171, 2001.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: Uma Abordagem da Química à Ecologia. **Química Nova**. v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MONTEIRO, J. M. et al. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 105, n. 1-2, p. 173-186, 2006.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**. v. 1054, p. 95-111, 2004.

OJALA, T. et al. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 73, p. 299-305, 2000.

OSÓRIO, A.C.; MARTINS, J.L.S. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 40, n. 4, p. 481-486, 2004.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PEIXOTO, M. S. **Obtenção, caracterização e avaliação toxicológica de extrato seco padronizado à base de *Bauhinia forficata* Link.** Recife: 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 4, p. 683-689, 2008.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Análise da pluviosidade e do efeito de borda sobre os teores de flavonoides em *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 3, p. 740-745, 2009.

REINALDO, R. C. P. S. et al. Do ferns and lycophytes function as medicinal plants? A study of their low representation in tradicional pharmacopoeias. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 175, p.39-47, 2015.

ROCHA, C. S. et al. Morfoanatomia de Folhas de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae); uma Espécie Utilizada como Medicinal no Nordeste do Brasil. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 23, n. 4, p. 472-476, 2004.

ROCHA, C. S. **Estudo Comparativo Farmacognóstico e Atividade Biológica de *Maytenus rigida* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss (Celastraceae)**. Recife: 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco.

RODRÍGUEZ, F. M. et al. New phenolic triterpenes from *Maytenus blepharodes*. Semisynthesis of 6-deoxoblepharodol from pristimerin. **Tetrahedron**. v. 61, p. 2513-2519, 2005.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. P. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 2004. Cap. 24, p. 615-656.

SANTOS, V. L. et al. Pharmacological studies of ethanolics extracts of *Maytenus rigida* Mart (Celastraceae) in animal models. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 17, n. 3, p. 336-342, 2007.

SANTOS, V. L. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Rev. Bras. Pl. Med.** v.13, n.1, p. 68-72, 2011.

SBFgnosia – Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Disponível em: <http://www.sbfgnosia.org.br>. Acesso em: 15 de Junho de 2015.

SIEBRA, A. L. A. et al. Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 2016.

SILVA, C. V. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 3, p. 355-360, 2010.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVEIRA, C. F. S. ***Zanthoxylum rhoifolium* Lamarck (Rutaceae): Determinação da atividade antimicrobiana e caracterização físico-química e biológica**. Santa Maria: 1997. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêutica) - Universidade Federal de Santa Maria.

SILVEIRA, L. M. S. et al., Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.** v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; E LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol.** v. 299, p. 152-178, 1999.

SKALICKA-WOŹNIAK, K. et al. Implication of coumarins towards central nervous system disorders. **Pharmacological Research.** v. 103, p. 188-203, 2016.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 2004. Cap. 13, p.289-326.

SOUZA, M. M. et al. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.). **Rev. Inst. Adolfo Lutz.** v. 68, n. 2, p. 192-200, 2009.

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

SVOBODOVÁ, A.; PSOTOVA, J.; WALTEROVA, D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký.** v. 147, n. 2, p. 137-145, 2003.

TCHINDA, C. F. et al. Antibacterial Activities of the Methanol extracts of *Albizia adianthifolia*, *Alchornea laxiflora*, *Laportea ovalifolia* and Three other Cameroonian Plants against Multi-Drug Resistant Gram-negative Bacteria. **Saudi Journal of Biological Sciences.** 2016.

VELLOSA, J. C. R. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitoterapia.** v. 77, n. 3, p. 243-244, 2006.

VIEIRA, D. et al. Development of hydroethanolic extract of *Ipomoea pes-caprae* using factorial design followed by antinociceptive and anti-inflammatory evaluation. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 23, n. 1, p. 72-78, 2013.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis.** 2.ed. New York: Springer Verlag, 1996.

WANG, Q.; WANG, H.; XIE, M. Antibacterial mechanism of soybean isoflavone on *Staphylococcus aureus*. **Arch Microbiol.** v. 192, p. 893-898, 2010.

WEIGEL, L. M. et al. High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with polymicrobial biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 51, n. 1, p. 231-238, 2007.

WONG, W. H. et al. Two level half factorial design for the extraction of phenolics, flavonoids and antioxidants recovery from palm kernel by-product. **Industrial Crops and Products.** v. 63, p. 238-248, 2015.

YAO, L. H. et al. Flavonoids in Food and their Health Benefits. **Plant Food for Human Nutrition.** v. 59, p. 113-122, 2004.

YEDHU KRISHNAN, R.; RAJAN, K. S. Microwave assisted extraction of flavonoids from *Terminalia bellerica*: Study of kinetics and thermodynamics. **Separation and Purification Technology**. v. 157, p. 169-178, 2016.

ZHU, C.; LIU, X. Optimization of extraction processo f crude polysaccharides from pomegranate peel by response surfasse methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1197-1202, 2013.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. da UFRGS/ UFSC, 2004, Cap. 23, p. 577-614.