

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
REDE NORDESTE BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)
LABORATÓRIO DE QUÍMICA E INOVAÇÃO TERAPÊUTICA (LqIT)



RONALDO DOERING MOTA

**OBTENÇÃO DE FORMAS FARMACÊUTICAS À BASE DE EXTRATO
ETANÓLICO DE *Byrsonima crassifolia* (L.) Rich (murici) PARA TRATAMENTO
ANTIBACTERIANO E ANTIOXIDANTE**

Recife
2019

RONALDO DOERING MOTA

**OBTENÇÃO DE FORMAS FARMACÊUTICAS À BASE DE EXTRATO
ETANÓLICO DE *Byrsonima crassifolia* (L.) Rich (murici) PARA TRATAMENTO
ANTIBACTERIANO E ANTIOXIDANTE**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação RENORBIO (Rede Nordeste de Biotecnologia), como requisito parcial para o recebimento do título de Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Área de concentração: Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria do Carmo Alves de Lima.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia de Maria Silva Figueiredo.

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Mota, Ronaldo Doering

Obtenção de formas farmacêuticas à base de extrato etanólico de *Byrsonima crassifolia* (L.) Rich (murici) para tratamento antibacteriano e antioxidante / Ronaldo Doering Mota - 2019.

105 folhas: il., fig.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima

Coorientadora: Patrícia de Maria Silva Figueiredo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2019.

Inclui referências e anexos

1. Fitoterápicos 2. Antibacteriano 3. Antioxidante

I. Lima, Maria do Carmo Alves de (orient.) II. Figueiredo, Patrícia de Maria Silva (coorient.) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-113

RONALDO DOERING MOTA

OBTENÇÃO DE FORMAS FARMACÊUTICAS À BASE DE EXTRATO ETANÓLICO SECO DE *Byrsonima crassifolia* (L.) Rich (murici) PARA TRATAMENTO ANTIBACTERIANO E ANTIOXIDANTE

Tese defendida em 11 março de 2019 como exigência parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Área de concentração: Saúde.

Data de aprovação: 11/03/2019

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima
Departamento de Antibióticos -UFPE

Prof^a. Dr^a. Anekécia Lauro da silva
Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF

Prof^a. Dr^a. Rosali Maria Ferreira da Silva
Departamento de Ciências Farmacêuticas– UFPE

Prof. Dr. Tiago Bento de Oliveira
Instituto Federal de Alagoas - IFAL

Prof. Dr. Luiz Nascimento De Araújo Neto
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

AGRADECIMENTOS

Ao meu grande amor Neon Bruno, pelo apoio incondicional e por me acompanhar em todos os meus sonhos.

Aos meus pais e irmãos.

As professoras Dr^a. Patrícia e Dr^a. Maria do Carmo, pela paciência e pela oportunidade.

Ao Laboratório de Química e Inovação terapêutica da Universidade Federal do Pernambuco.

Ao Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão.

Aos amigos, que participaram direta ou indiretamente desta conquista.

RESUMO

A procura por produtos naturais derivados de plantas como alternativa para a utilização em terapias tem aumentado consideravelmente. A partir dessa busca, a fitoterapia é a medicina alternativa que mais tem se disseminado na sociedade moderna. O objetivo deste trabalho foi analisar o perfil fitoquímico, a atividade antimicrobiana do extrato proveniente das folhas de *Byrsonima crassifolia* e manipular formulações farmacêuticas para uma ação antimicrobiana. Foi feita a coleta e identificação do material botânico. Após a obtenção do extrato etanólico, realizou o Fracionamento por partição líquido-líquido e isolada a fração hexânica, acetato de etila e aquosa do extrato. A atividade antioxidante foi determinada através do método de redução do DPPH e calculada a concentração bactericida mínima e inibitória mínima para o extrato e suas frações. Foi manipulado um creme, uma solução e um sabonete líquido contendo extrato etanólico das folhas do murici a 1% e 5%. O extrato não foi tóxico a linhagem de células cancerígenas de mama e próstata. Foi observada a presença de fenóis (taninos condensados, catequinas e flavonóides), esteroides, alcaloides saponinas através da análise fitoquímica do extrato. Os perfis de fragmentação dos componentes do extrato foram obtidos através das análises por LC-MSⁿ. Este extrato apresentou potencial antioxidante com inibição de 88,94% do radical DPPH. A estabilidade foi analisada tanto no sabonete, quanto na solução tópica e no creme manipulado a partir do extrato a 1 a 5%. Essa análise ocorreu no tempo zero e cento e oitenta dias após a formulação. O controle de qualidade microbiológico também foi realizado. Realizou-se a técnica de microdiluição em caldo para avaliar a atividade antimicrobiana; o extrato hidroetanólico (70%), as frações acetato de etila e hexânica, e os produtos manipulados mostraram atividade antimicrobiana em todas as amostras testadas, com a CIM variando entre 0,6 e 19,2mg/mL, exceto as frações orgânicas (acetato de etila e hexânica) que não apresentaram atividade para o *Acinetobacter baumannii*. Pela técnica de hemólise, a toxicidade foi avaliada e não foi observada atividade hemolítica até concentração testada de 100mg/mL. A toxicidade frente à *Artemia salina* demonstrou um DL₅₀ de 3614 µg/mL no extrato, sendo classificado como atóxico frente a *Artemia salina*. O extrato possui atividade microbiana, antioxidante, com baixo grau de toxicidade *in vitro*. Os produtos manipulados mostraram-se potencialmente viáveis no desenvolvimento de novos fitoterápicos para o tratamento de doenças infecciosas.

Palavras-chave: Fitoterápicos. Antibacteriano. Antioxidante. Muricizeiro.

ABSTRACT

Currently, the demand for natural products derived from plants as an alternative to the use in therapies has increased considerably. From this search, phytotherapy is the alternative medicine that has most spread in modern society. This work aimed to analyze the phytochemical profile, the antimicrobial activity of the extract from the leaves of *Byrsonima crassifolia* and to develop pharmaceutical formulations for an antimicrobial action. The botanical material was collected and identified. After obtaining the ethanolic extract, the fractionation was performed by liquid-liquid partition and isolated the hexanic fraction, ethyl acetate and aqueous extract. The antioxidant activity was determined by the DPPH reduction method and the minimum and minimal inhibitory bactericidal concentration was calculated for the extract and its fractions. A cream, a solution and a liquid soap containing ethanolic extract from the leaves of the murici at 1% and 5%. The extract was not toxic to the lineage of breast and prostate cancer cells. The presence of phenols (condensed tannins, catechins and flavonoids), steroids, and alkaloid saponins were observed through the phytochemical analysis of the extract. The fragmentation profiles of the compounds present in the extract were obtained by LC-MSn analysis. This extract presented antioxidant potential with inhibition of 88.94% of the DPPH radical. Stability was analyzed in both the soap, the topical solution and the cream manipulated from the 1 to 5% extract. This analysis occurred at time zero and thirty days after formulation. Microbiological quality control was also performed. The broth microdilution technique was performed to evaluate the antimicrobial activity; the hydroethanolic extract (70%), the hexane, ethyl acetate and the manipulated products presented antimicrobial activity with MIC between 0.6 and 19.2 mg / mL against all the microorganisms tested, except the organic fractions (ethyl acetate and hexane) that showed no activity against *Acinetobacter baumannii*. By the hemolysis technique, the toxicity was evaluated and no hemolytic activity was observed up to a concentration of 100 mg / mL. The toxicity to *Artemia salina* demonstrated an LD 50 of 3614 µg / mL in the extract, being classified as non-toxic to *Artemia salina*. The extract has microbial activity, antioxidant, with low degree of toxicity in vitro. Pharmaceutical formulations have been shown to be potentially viable in the development of novel drugs for the treatment of infectious disease:

Keywords: Phytotherapics. Anti-bacterial. Antioxidant. Muricizeiro.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fotografias representativas do Murici (*Byrsonima sp.*): anteses florais a), folhas e frutos, frutos imaturos e frutos maduros.....33
- Figura 2** - Verificação da atividade antioxidante do EH das folhas de *B. crassifolia*.....55
- Figura 3** - Formulações farmacêuticas manipuladas a partir do extrato das folhas de *B. crassifolia*.....63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BHT	Hidroxitolueno butilado
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DL ₅₀	Dose necessária de uma dada substância matar 50% de uma população em teste
CE ₅₀	Concentração da amostra responsável pelo efeito em 50 % dos organismos testados
CL ₅₀	Concentração da amostra responsável pelo efeito em 50 % dos organismos testados
DPPH	1,1-difenil-2-picrildazila
EE	Extrato etanólico
EtOH	Extrato hidroetanólico
H ₅₀	Dose efetiva que causa 50% de hemólise
ID	Índice de Desnaturação
IN	Indeterminado
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
MeOH	Metanol
N.D	Não Determinado
N.I	Não Identificado
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UV	Ultravioleta
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>

PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)
DMSO	Dimetilsufóxido
SNC	Sistema Nervoso Central
ABTS	Ácido sulfônico 2'-azino- <i>bis</i> -(3-etilbenzotiazoline)
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo Geral	15
1.1.2	Objetivos Específicos	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1	Biodiversidade.....	16
2.2	Plantas medicinais.....	17
2.3	Metabolitos secundário	19
2.4	Atividade antioxidante pelo método DPPH.....	22
2.5	Atividade citotóxica.....	23
2.6	Atividade antimicrobiana.....	24
2.7	Resistência antimicrobiana	27
2.8	Métodos para determinação da atividade antimicrobiana.....	29
2.9	Família Malpighiaceae.....	31
2.10	Estabilidade dos produtos formulados a partir de extratos.....	34
3	METODOLOGIA.....	36
3.1	Coleta e identificação do material botânico	36
3.2	Obtenção do EE	36
3.3	Fracionamento por partição líquido-líquido.....	36
3.4	Screening fitoquímico.....	37
3.4.1	Teste para Fenóis e Taninos	37
3.4.2	Teste para Flavonoides	37
3.4.3	Teste para Cumarinas	38
3.4.4	Teste para Alcaloides.....	38
3.4.5	Teste para Triterpenos e Esteroides.....	38
3.4.6	Teste para Saponinas	39
3.5	Atividade antioxidante	39

3.6	Atividade Citotóxica	40
3.7	Manipulação das formulações farmacêuticas	40
3.8	Controle de qualidade físico-químico das formulações farmacêuticas.....	42
3.8.1	Teste de centrifugação	42
3.8.2	Avaliações organolépticas	42
3.8.3	Determinação de pH	43
3.8.4	Determinação de viscosidade	43
3.8.5	Controle de qualidade microbiológico das formulações	43
3.9	Atividade antimicrobiana: EE, frações e formulações.....	44
3.9.1	Seleção das cepas bacterianas.....	44
3.9.2	Preparo das suspensões microbianas	44
3.10	Triagem pelo Método de difusão em Agar	44
3.11	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição.....	45
3.12	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	45
3.13	Avaliação da atividade hemolítica do extrato das folhas de <i>B. crassifolia</i>	45
3.13.1	Isolamento das hemácias (Preparo da suspensão de hemácias).	45
3.13.2	Avaliação da IC50(50% de inibição de atividade hemolítica).	45
3.13.3	Hemólise.....	46
3.13.4	Desnaturação.	46
3.14	Toxicidade frente às larvas de <i>Artemia salina</i> Leach	47
3.14.1	Cultura das larvas de <i>Artemia salina</i> Leach	47
3.14.2	Preparo da amostra e determinação do valor da DL50.....	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1	Rendimento do EE.....	49
4.2	Triagem fitoquímica do EE	49
4.3	Atividade antioxidante do EE das folhas de <i>B. crassifolia</i>	54
4.4	Atividade Citotóxica.....	60
4.5	Teste preliminar de estabilidade das formulações farmacêuticas.....	62
4.5.1	Determinação da viscosidade	67
4.5.2	Controle de Qualidade Microbiológico do extrato e formulações farmacêuticas.	68
4.6	Método de difusão do EE e da solução em Agar.....	70

4.7	Atividade antimicrobiana do EE a partir das folhas de <i>B. crassifolia</i> (Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima)	71
4.8	Atividade antimicrobiana das frações acetato de etila, hexânica e aquosa a partir das folhas de <i>B. crassifolia</i>	73
4.9	Atividade antimicrobiana das formulações farmacêuticas manipuladas a partir do EE das folhas de <i>B. crassifolia</i>	75
4.10	Avaliação da atividade hemolítica do extrato das folhas de <i>B. crassifolia</i>	78
4.11	Toxicidade frente <i>Artemia salina</i> Leach.	79
5	CONCLUSÃO.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXO A - REQUERIMENTO DE PATENTE CONCEDIDA PELO INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL – INPI.....	102
	ANEXO B - ALGUNS DOS COMPONENTES MAJORITÁRIOS IDENTIFICADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos, os seres humanos utilizam plantas como remédios naturais. Hipócrates, considerado o pai da medicina, há mais de 3 mil anos já dizia “que o teu alimento seja o teu remédio e que o teu remédio seja o teu alimento”. Durante muito tempo, o uso de ervas medicinais foi o principal responsável pelas práticas curativas. Com o passar das gerações, as ciências da saúde evoluíram e isso trouxe uma série de novos procedimentos para tratar doenças. Uma dessas maneiras é o uso de medicamentos industrializados, que, progressivamente, acabaram sendo introduzidos no nosso cotidiano, sobretudo devido a campanhas publicitárias que prometiam curar diversos males. Desde então, as plantas medicinais vêm sendo substituídas por medicamentos alopáticos (BADKE et al., 2011).

Contudo, ultimamente, diversos estudos sobre fitoterápicos foram resgatados e intensificados com intuito de proporcionar terapias alternativas para o controle bacteriano. Produtos de origem natural, menos tóxicos e mais seguros, são a cada dia que passa mais procurados pelos consumidores que estão cada vez mais exigentes e preocupados com a qualidade dos produtos que consomem (PACKER; LUZ, 2007; WHO, 2013).

Diante das transformações sociais, econômicas e culturais, nos últimos tempos, surgiu uma nova tendência e emergiu a necessidade mundial de aumentar a demanda por preparações de origem vegetal como fórmula terapêutica. Ora, tudo isso impulsionou a criação de um programa nacional de promoção de práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais, fitoterápicos e remédios caseiros (BRASIL, 2009).

Posto isso, é importante que sejam estudadas as formulações desses compostos, bem como os vegetais utilizados, na tentativa de produzir os fitocosméticos e medicamentos fitoterápicos de eficácia reconhecida (FENNER, 2006).

Como se depreende, as plantas medicinais desempenham um importante papel na saúde e alcançou um status de bem-estar mundial. Estima-se que cerca de 30% das drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR, 2008). Além disso, dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstram que mais ou menos 80% da população mundial faz uso de algum tipo de erva na busca de alívio da alguma sintomatologia dolorosa e/ou desagradável. Desse total, pelo menos 30% deu-se por indicação médica (LOURENÇO, 2018).

Estudos sobre substâncias farmacologicamente ativas, obtidas de extratos vegetais, proporcionam descobertas de novos princípios bioativos de aplicação nos tratamentos de diversas doenças humanas. Como exemplo disso, aproximadamente 60% dos agentes

antitumorais e anti-infecciosos que são comercializados ou que estão em fase clínica final é derivada de produtos naturais (DAVID et al., 2014).

Estudos também demonstram que a família *Malpighiaceae* apresenta vários efeitos farmacológicos, dentre as espécies destaca-se a *Byrsonima crassifolia*, conhecida popularmente como murici, que é o objeto central da presente pesquisa. As folhas e casca do murici vêm sendo utilizadas na medicina tradicional para tratar tosse, distúrbios gastrointestinais, infecções ginecológicas e da pele (HEINRICH et al. 1992) e até picadas de cobra (RASTRELLI et al. 1997). Dados obtidos no NAPRALERT (*Natural Products Alert Database*) indicaram que as espécies deste gênero são comumente empregadas pela medicina tradicional como antiasmáticas, antitérmicas e no tratamento de infecções de pele (CACERES, et al., 1993). Esta família é predominantemente tropical com 65 gêneros e cerca de 1.250 espécies, das quais aproximadamente 85% são neotropicais.

No Brasil, vislumbram-se por volta de 44 gêneros e 561 espécies, distribuídas em diversas formações vegetais (MAMEDE et al, 2015). Os membros do gênero *Byrsonima* são popularmente conhecidos como “murici”, “murici-cascudo” ou “murici-vermelho” e empregados não apenas na medicina tradicional, mas também como no preparo de alimentos como sucos, geleias e licores, principalmente nas regiões norte e nordeste do país (MARINHO, 2008 apud SANNOMYIA, et al., 2015). Essas plantas são encontradas em diferentes regiões do cerrado brasileiro e apresentam variedades distintas, porque se diferenciam a depender das características do solo onde são plantadas e das condições climáticas (BELISÁRIO; CONEGLIAN, 2013).

A percepção do uso popular crescente do murici foi o *insight* dessa pesquisa, cujo objetivo principal foi avaliar a atividade antibacteriana e antioxidante de fórmulas farmacêuticas à base de extrato etanólico (EE) obtidas a partir das folhas de *B. crassifolia*, utilizando-se, para a realização dos testes, de ensaios microbiológicos padronizados.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Analisar o perfil fitoquímico, atividade antibacteriana e antioxidante do extrato etanólico (EE) das folhas de *Byrsonima crassifolia* e desenvolver formulações farmacêuticas com atividade antimicrobiana e antioxidante.

2.1.2 Objetivos Específicos

- i. Analisar o perfil fitoquímico do extrato etanólico (EE) a partir das folhas de *B. crassifolia*;
- ii. Avaliar a toxicidade do extrato etanólico e das formulações farmacêuticas das folhas de *B. crassifolia* frente *Artemia salina*;
- iii. Determinar potencial antioxidante do extrato das folhas de *B. crassifolia* nas concentrações de 1% e 5%;
- iv. Determinar a citotoxicidade em células do extrato das folhas de *B. crassifolia*;
- v. Manipular um creme, uma solução e um sabonete contendo EE a partir das folhas de *B. crassifolia*;
- vi. Avaliar a estabilidade das formulações manipuladas, através de estudos acelerados.
- vii. Avaliar a atividade antimicrobiana do creme, da solução e do sabonete manipulados com extrato das folhas de *B. crassifolia* em Ágar;
- viii. Determinar a atividade antibacteriana através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato, das frações e das formulações farmacêuticas das folhas de *B. crassifolia*;
- ix. Avaliar a atividade hemolítica do extrato e das formulações farmacêuticas das folhas de *B. crassifolia*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biodiversidade

Levando-se em consideração o contexto amplo de biodiversidade genética no país, as plantas superiores emergem como importante fonte para a descoberta de novos fitoterápicos. A Floresta Amazônica é o bioma brasileiro que tem uma maior importância nacional e internacional devido à grande diversidade biológica e principalmente pela imensa área territorial e como reserva de água doce (VIEIRA; RICHINS, 2002).

A biodiversidade abrangente apresentada no Cerrado e na Mata Atlântica, apesar de seu papel fundamental no avanço dos estudos de fitoterápicos, está sendo comprometida pela intervenção humana. Não raras vezes, matas são destruídas no processo de ocupação humana em suas atividades exploratórias. Apesar disto, o contexto da biodiversidade no país continua propício a impulsionar pesquisas nesta linha. O potencial terapêutico da flora brasileira pode ser comprovado, inclusive, na quantidade de publicações em revistas científicas na área de produtos naturais: o Brasil ocupa uma posição de destaque quando comparado aos países da América Latina (CALIXTO, 2005).

A verdade é que, ultimamente, uma gama de variedades de plantas está sendo utilizado na medicina popular em virtude do esperado poder curativo e preventivo e, simultaneamente, pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de possibilitar a disponibilização dessas plantas para o consumo como medicamentos (LANGLEY, 2000). A utilização de produtos naturais pelo homem é muito antiga, seja para fins nutricionais ou terapêuticos, e ainda hoje continuam a ser usados em preparações farmacêuticas e em composto puro ou extratos (ARAÚJO, 2001).

A economia mundial baseia-se principalmente em produtos e processos relacionados à biodiversidade. Estima-se que 40% da economia está ligada em particular aos setores de alimentos, combustíveis, fibras, madeira, extratos, óleos, medicamentos e cosméticos (CDB, 2011; CNI, 2014). Esse cenário demonstra que a diversidade biológica é constantemente referida como uma das possíveis fontes de vantagem competitiva para o Brasil no mercado global, sendo a indústria farmacêutica um dos setores mais promissores para seu aproveitamento (PIMENTEL et al., 2015).

2.2 Plantas Medicinais

A fitoterapia é um recurso terapêutico caracterizado pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas que incentiva o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social (BRASIL, 2006).

O uso de plantas medicinais pelo homem acompanha a sua história. Povos antigos como os Gregos, Hindus, Egípcios, Persas e depois os povos da América, usavam rotineiramente os recursos terapêuticos. No Brasil, o uso de plantas medicinais é anterior à chegada dos Portugueses, à medida que os colonizadores percebiam os valiosos recursos da medicina indígena, aos poucos, iam construindo sua própria farmacopéia (ROCHA, 2015).

Durante o séc. XVI, as informações disponíveis sobre plantas medicinais, suas indicações e posologias, eram observadas pelos missionários conforme a colonização adentrava as regiões do Recôncavo Baiano, Floresta Amazônica e Zonas Costeiras. O conhecimento indígena era registrado – leia-se, incorporado e adaptado – pelos padres jesuítas para, então, elaborar suas próprias prescrições (WALKER, 2013).

O uso de plantas medicinais no Brasil é bastante difundido e suas potencialidades neste setor são reconhecidas mundialmente (SIMÕES, 2000). As plantas medicinais podem ser definidas como vegetais que possuem substâncias com ação farmacológica. Estima-se que pelo menos metade das espécies nativas tenha alguma propriedade medicinal, contudo nem 1% chegou a ser estudada adequadamente (SIMÕES, 2000). A maioria das pessoas encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos. Isso se justifica tanto pela riqueza da biodiversidade quanto pela tradição popular desta prática, mas também, principalmente, pelo baixo poder aquisitivo da população que não dispõe de recursos financeiros para aquisição de medicamentos industrializados (DI STASI, 2016).

Assim, para garantir a segurança do uso de plantas medicinais pela sociedade como terapêutica utilizada no tratamento de enfermidades são necessárias não apenas medidas de controle, mas realização de campanhas que promovam informações sobre o uso racional dessa prática relatando os riscos e benefícios existentes encontrados a partir de seu uso (SILVA et al., 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) conhecendo essa realidade lançou, em 1972, um incentivo à medicina tradicional. Na ocasião, a fitoterapia foi considerada uma das práticas mais importantes pelo potencial encontrado, especialmente quando na avaliação do

custo benefício que ela poderia dispor aos seus usuários. Para além disso, a fitoterapia possui uma grande adesão da população em geral devido aos custos menores (BUTLER, 2008).

Na perspectiva da integridade da atenção à saúde, é importante que se promova estratégias baseadas em tratamentos alternativos para que sejam disponibilizados à comunidade. A ampliação das opções terapêuticas ofertadas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) – todas com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade – torna-se indispensável para o modelo de assistência básica (DUTRA, 2009). O Brasil possui vantagens e oportunidades para o desenvolvimento da fitoterapia devido ao seu potencial em biodiversidade, mas também em razão do crescente interesse popular e institucional conquistado através das políticas de inclusão de medicamentos fitoterápicos no SUS (SANTOS 2006).

O governo federal aprovou por meio do Decreto Presidencial nº 5.813 de 22 de junho de 2006, a Política Federal de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. O Decreto inaugura as políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social, tendo como principal objetivo “garantir à população brasileira o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010).

Para a confirmação da qualidade, eficácia e segurança na terapêutica das plantas medicinais são necessários estudos químicos e estudos detalhados das propriedades biológicas. Apesar de ser fitoterápico, o seu uso indiscriminado pode promover efeitos adversos, já que estes compostos podem apresentar algumas substâncias nocivas, ou até mesmo a possibilidade de ocorrer interação medicamentosa com outros remédios usados concomitantemente (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). A valorização das plantas medicinais ocasionou um crescimento na procura de informações comprovadas cientificamente sobre a segurança e eficácia terapêutica destas plantas, incentivando as pesquisas na área (NIERO, et al., 2003). Os produtos naturais têm sido a maior fonte de diversidade química para iniciar a condução de descobertas terapêuticas ao longo do último século.

Historicamente, as companhias farmacêuticas têm utilizado extratos de plantas para produzir formulações terapêuticas. Porém, no século XX, com o avanço das técnicas de isolamento e purificação, formulações de fármacos com compostos bastante purificados tornaram-se mais típicas (TIWARI; MISHRA, 2011). De acordo com os dados do FDA (*Food and Drug Administration*), do total de novas substâncias ativas (NAS – *New Active*

Substances, conhecidas também por NCEs – *New Chemical Entities*) registradas nos últimos 30 anos (de 01/01/1981 a 31/12/2010), aproximadamente 6% são produtos naturais.

Dados mostram que os produtos naturais e estruturas derivadas desempenharam e ainda desempenham um grande papel no desenvolvimento do arsenal terapêutico médico, mostrando assim a importância do incentivo às pesquisas para descoberta de novos fármacos. Embora se tenha um grande avanço tecnológico, tem-se também uma maior rigidez nas normas e legislações para a aprovação e liberação de um novo fármaco no mercado, tornando os atuais números de novos fármacos menores que no passado. Entretanto, um ponto motivador para a química de produtos naturais, é que no ano de 2010, das 20 NASs aprovadas, metade estava inserida na categoria dos produtos naturais incluindo a maioria dos agentes antitumorais (CRAGG; NEWMAN, 2012).

Portanto, é necessário a elaboração de técnicas de otimização e padronização de preparações vegetais, com o objetivo de obtenção de um medicamento próprio para o consumo humano de boa qualidade, seguro, estável, com boa eficácia e puro. (CRAGG; NEWMAN, 2007).

2.3 Metabólitos Secundários

Os compostos produzidos pelas plantas são distribuídos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são conhecidos por serem moléculas que se encontram em todas as células vegetais e são necessários para a vida da planta. São os açúcares, aminoácidos, proteínas, lipídios e os ácidos nucleicos. Os metabólitos secundários são restritos em sua distribuição e são importantes para sobrevivência e propagação das plantas capazes de produzir diferentes compostos: fenóis, terpenóides, óleos essenciais, alcaloides, entre outros. São essas as principais moléculas químicas responsáveis pelos efeitos medicinais, ou tóxicos, das plantas e apresentam grande importância ecológica, uma vez que podem atuar na atração de polinizadores, ou representar uma defesa química contra agentes agressores ambientais (LÓPEZ, 2016).

O cenário de grande utilidade e diversidade de metabólitos secundários dos vegetais desperta interesse de pesquisadores do mundo inteiro, porque são fontes promissoras para o isolamento de novas moléculas a serem descobertas em diferentes aplicabilidades na vida humana. As indústrias agronômicas, alimentícias e farmacêuticas são partes interessadas na descoberta dessas moléculas, porque, devido às suas propriedades, possuem elevada importância comercial. Em virtude da crescente popularidade dos medicamentos fitoterápicos

e da mudança de perspectiva dos consumidores, que hoje buscam cada vez mais alimentos com características bioativas que lhes proporcionem mais saúde e bem-estar através de ativos encontrados na natureza, é importante investir em investigações científicas sobre suas propriedades terapêuticas (DINIZ; ASTARITA; SANTAREM, 2007).

Na aplicação de estratégias de planejamento de fármacos oriundos do metabolismo secundários das plantas, os estudos dos processos evolutivos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos assumem grande importância, pois constituem as bases fundamentais para o entendimento de propriedades como potência, afinidade e seletividade. Por isso, as ferramentas biotecnológicas associadas aos métodos de estudos fitoquímicos ganham força no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). Os estudos fitoquímicos ajudam na investigação desses compostos através de métodos de análises que permitem a quantificação, separação, isolamento e identificação da simbiose existente entre centenas de diferentes metabólitos secundários encontrados em uma planta. Apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica com diferentes finalidades. Desta forma, verifica-se que o reino vegetal representa um enorme reservatório de moléculas farmacologicamente ativas a serem descobertas (PINTO, 2005).

Os metabólitos secundários são divididos em três grandes grupos distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (SHAHIDI; NACZK, 2003; SHAHIDI; HO, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2006). Dentre os terpenos, encontram-se os compostos voláteis que compõe os óleos essenciais com aplicação em sabores e perfumes, a função dos óleos essenciais nas plantas pode ser tanto para atrair polinizadores quanto para repelir insetos. Os compostos fenólicos são representados pelo um grupo bastante heterogêneo que além de sua importância na proteção de plantas contra fatores ambientais, estão presentes em frutas e em muitos sabores, odores e coloração dos vegetais. Dentre o grupo de compostos contendo nitrogênio destaca-se a classe dos alcaloides, que também tem função de defesa contra insetos e animais predadores nas plantas (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação inversa entre o consumo de frutas e verduras, e o risco do desenvolvimento de determinados cânceres. Porém, é improvável que apenas uma substância seja responsável por essa associação. A combinação dos flavonóides genisteína e quercetina produziu uma ação sinérgica contra células do carcinoma ovariano (SHEN, 2017).

Neste sentido, e levando-se em consideração as propriedades da quercetina (quais sejam: regular o ciclo celular, interagir com os locais de ligação do estrogênio tipo II,

diminuir a resistência às drogas e induzir a apoptose de células tumorais), é correto afirmar que este flavonóide natural pode vir a tornar-se um potente composto antitumoral. A quercetina, ainda, foi considerada um efetivo agente preventivo, em virtude de bloquear a promoção do melanoma (XIAO, 1998).

Estudos demonstram algumas dessas propriedades. Um estudo de Avila (1994) constatou que a quercetina inibiu a proliferação celular da linhagem MDA MB 468 (tumor de mama humano). Outro estudo mostrou uma relação inversa entre o consumo de flavonóides e a incidência de câncer pulmonar, em homens e mulheres acima de 20 anos de idade, sendo que a quercetina representava cerca de 95% do consumo total de flavonóides neste estudo. Hertog Hollman e Katan (1992) realizaram o primeiro estudo epidemiológico com 805 homens com faixa etária entre 65 a 84 anos, no qual examinaram a relação entre consumo de flavonóides e risco de desenvolver doenças cardiovasculares (KNEKT, 1997). Knekt (1997) observou uma redução de 22% na mortalidade por doença cardiovascular em finlandeses sendo que a quercetina contribuiu com 95% do total de flavonóides ingeridos por esta população. Kuhlmann (1998) demonstrou que a quercetina protege as células epiteliais renais da toxicidade da cisplatina, *in vitro*. A ingestão oral de quercetina pode proteger o fígado contra a falência induzida por isquemia-reperfusão, pela melhora da capacidade antioxidativa hepática (SU, 2003).

O planejamento da pesquisa fitoquímica para identificação dos grupos de metabólitos secundários deve ser feito de acordo com os objetivos específicos que se pretende atingir, seja ele químico, farmacológico ou ainda dirigido para um determinado tipo de ação, por exemplo, inseticidas naturais, ou ainda classes especiais de substância de interesse tecnológico como os óleos fixos e óleos essenciais. Por isso, o planejamento da prospecção fitoquímica deve obedecer a dois princípios: simplicidade necessária à rapidez de execução e complexidade necessária à precisão dos resultados e à maior amplitude de informações (MATOS, 2009).

As análises dos estudos fitoquímicos são importantes principalmente para aquelas espécies de plantas medicinais que ainda não dispõe de estudos químicos, tendo como objetivo conhecer estes compostos e avaliar sua presença identificando quais grupos de metabólitos secundários relevantes está presente na qualidade da matéria prima medicinal (LEITE, 2009; SIMÕES, 2004). Para isto é necessário que exista uma atuação interdisciplinar nas buscas direcionadas da bioatividade levando em conta os aspectos agrotecnológicos, microbiológicos, farmacológicos e biotecnológicos (FOGLIO et al., 2006).

2.4 Atividade antioxidante pelo método DPPH

Os compostos antioxidantes são um grupo de compostos capazes de prevenir processos degenerativos associados a radicais livres no organismo. A busca por alimentos e novos produtos com propriedades antioxidantes oriundos de fontes naturais torna-se cada vez mais crescente. O conhecimento de substâncias com atividade antioxidante presentes nos alimentos, das quais muitas ainda não foram suficientemente estudadas, destaca-se tanto pela possibilidade de ter aproveitamento como alimentos funcionais quanto pelo fornecimento de compostos que se enquadram como nutracêuticos (RUFINO, 2010; ALVES et al., 2017).

Muitos estudos sobre antioxidantes têm sido realizados, sobretudo devido às descobertas sobre o efeito deletério de radicais livres e agentes oxidantes no organismo. Esses radicais livres, além de instáveis, são moléculas bastante reativas, que acarretam doenças cardiovasculares, câncer, catarata, disfunções cerebrais, declínio do sistema imune e diabetes mellitus tipo I. (NASCIMENTO, 2011; RAMOS, 2011).

O radical estável DPPH tem sido usado para a determinação da atividade antioxidante, que é a atividade sequestradora de compostos antioxidantes puros, extratos de plantas, frutos e alimentos (SOOBRAATTE, 2005). Os resultados obtidos da capacidade antioxidante pelo método DPPH têm sido apresentados de diversas formas e a falta de padronização dos resultados torna difícil comparar a capacidade antioxidante de uma mesma amostra, ou diferentes amostras (DENG; CHENG; YANG, 2011). A maioria dos resultados é apresentada como valor de CE_{50} ou CI_{50} , que é definida como a quantidade de antioxidante necessário para diminuir ou reduzir a concentração inicial do radical DPPH em 50% (CHEN, 2013).

O DPPH é um radical livre estável e não apresenta semelhança com os radicais livres mais reativos e não pode ser correlacionado a sistemas biológicos, ou seja, não é fisiologicamente relevante. (HUANG; PRIOR, 2005). O efeito dos antioxidantes no combate aos danos provocados por radicais livres conduziu a elaboração de métodos a fim de determinar a capacidade antioxidante de várias substâncias.

Um dos métodos mais usados para avaliar a atividade antioxidante *in vivo* ou *in vitro*, é o DPPH, considerado um método colorimétrico que usa a captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (RUFINO, 2007). O método DPPH não é apropriado para medir a capacidade antioxidante de plasma e soro humano, porque as proteínas podem precipitar no meio da reação em solução alcoólica (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009). No entanto, o método DPPH tem aplicação em soro desproteínado, sendo o estudo antioxidante em soro humano uma ferramenta importante (RYSZ, 2010).

Enzimas catalíticas produzem radicais livres durante o metabolismo celular ou devido a fatores exógenos. Tais radicais livres podem gerar estresse oxidativo, se produzidos em grandes quantidades, causando desequilíbrio entre o sistema pró-oxidante e antioxidante (NASCIMENTO, 2011).

O uso de antioxidantes encontradas nas plantas como, por exemplo, os compostos fenólicos, atuam combatendo a formação de radicais livres e diminuem as chances de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (MORAIS et al., 2009).

Métodos de sequestro do radical DPPH não envolvem condições alta oxigenação e temperatura elevadas, pois podereagir com os compostos fenólicos. Este método é utilizado na determinação da atividade antioxidante desubstâncias isoladas e de extratos. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R.), o DPPH é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, e muda a coloração de púrpura para a cor amarela, com conseqüente diminuição da absorção, e por isso pode ser monitorada por espectrofotometria. A partir dos resultados obtidos pela espectrofotometria, é determinada a porcentagem de sequestro de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio depois da reação química (DARONCHO, 2012).

A fonte dos compostos oxidantes presentes no extrato das folhas de *B. crassifolia* são possivelmente os compostos fenólicos. A busca por antioxidantes naturais tem sido frequente, a fim de alcançar a substituição ou redução do uso de antioxidantes sintéticos, já que apresentam efeitos colaterais significativos. Outro fator que impulsionada à descoberta de novos produtos antioxidantes é o efeito deletério dos radicais livres sobre as células como causador ou agravante de patologias (ALVES, 2010).

2.5 Atividade citotóxica

A Morte celular está presente durante o desenvolvimento de todos os organismos multicelulares, determinando o número de células, sua proliferação, seu tipo celular específico (MURRAY & CRISPE, 2004). É um assunto que tem atraído muita atenção pela grande quantidade de informação e que tem sido adquirida utilizando ferramentas de biologia celular e molecular.

Muitas plantas exercem efeito anti-proliferativo, reduzindo a viabilidade e inibindo o crescimento e a proliferação de linhagens celulares de câncer, através da indução do processo de apoptose (GARCIA et al., 2012).

O ensaio de citotoxicidade é um procedimento que visa avaliar a biocompatibilidade de um produto, isto é, o quanto este pode ser tóxico para uma determinada célula. Segundo Freshney (2000) os ensaios de citotoxicidade podem apresentar resultados temporais imediatos ou em curto prazo, estando associados, em ambos os casos, com a permeabilidade da membrana celular ou dano específico ao metabolismo da célula e tem por finalidade quantificar células viáveis expostas a condições traumáticas. As respostas de longo prazo dependerão da capacidade de renovação e sobrevivência da célula em estado alterado, que possa propiciar mutações genéticas, por exemplo, visando avaliar a capacidade metabólica ou proliferativa celular após ou durante contato com agentes tóxicos. De acordo com o guideline da *Organization for Economic Cooperation and Development* – OECD (2010), para testar substâncias químicas usando os testes *in vitro*, devem ser avaliadas no mínimo três concentrações diferentes da droga. Estas deverão ser escolhidas dos dados obtidos de estudos preliminares sobre citotoxicidade. Os testes de citotoxicidade *in vitro* são importantes para se verificar a toxicidade de novos compostos, principalmente quando se está verificando sua aplicabilidade como agente terapêutico (MELO et al., 2000). Entre os diferentes testes que podem ser utilizados na avaliação da citotoxicidade de um composto, destaca-se o ensaio MTT proposto por Mosmann (1983), o qual tem sido amplamente utilizado para determinar a viabilidade e proliferação de células após a exposição a substâncias tóxicas, e também para a caracterização da toxicidade de novos fármacos (MOSMANN, 1983; BERRIDGE et al., 2005).

O ensaio com MTT é um ensaio colorimétrico que se baseia na capacidade de células metabolicamente ativas reduzirem no meio intracelular o sal solúvel de tetrazólio dando origem a cristais de formazan, que é um produto de cor roxa, insolúvel em água, (MOSMANN, 1983).

2.6 Atividade antimicrobiana

Os medicamentos desempenham papel fundamental na proteção e recuperação da saúde, além de auxiliarem na manutenção e na melhoria da qualidade de vida. Aproximadamente um terço da população mundial tem dificuldade de acesso a medicamentos, pelos elevados preços, sendo que essa proporção aumenta para 50% em países em desenvolvimento (WHO, 2011). Os antimicrobianos são drogas com capacidade de interferir em distintas atividades da célula bacteriana, eliminando ou inibindo o crescimento do microrganismo (FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2016).

Os extratos de plantas possuem potencial terapêutico para infecções causadas por microrganismos resistentes. Dentre eles, se destacam a presença de flavonoides, que destroem a membrana citoplasmática de bactérias, inibindo assim a sua atividade enzimática. A descoberta de novos antibióticos originários de extratos de plantas representa uma nova forma de tratamento para doenças. A descoberta de novos antibióticos permite novos tratamentos onde se utiliza mais de um tipo de medicação (associação de remédios) para o tratamento de uma doença. (NASCIMENTO, 2011; OZAN, 2007).

Antimicrobianos são produtos capazes de inibir total ou parcialmente a replicação de microrganismos. São classificadas como antibióticos (substâncias produzidas por microrganismos) e como quimioterápicos (substâncias sintetizadas em laboratório ou produtos microbianos estruturalmente modificados). O uso dessas substâncias mudou o curso do tratamento clínico de doenças infecciosas e possibilitou a prevenção e ao tratamento de infecções antes sem opção terapêutica. Entretanto, o seu uso indevido e abusivo gerou dificuldades devido à progressiva resistência bacteriana a essas drogas. (MONTELLI, 2001).

Cinquenta por cento das drogas usadas no Ocidente apresentam fitoconstituintes vegetais ou derivados sintéticos na sua formulação. Medicamentos usados na medicina moderna foram inicialmente usados em formas tradicionais ou práticas de cura popular (PARAAKH; RAVICHANDRA, 2016). Baseado no uso destas plantas pela população, estudos utilizam ferramentas analíticas que possibilitam descobrir a estrutura química e viabilizam novos dados ao estudo farmacológico e microbiológico, com a possibilidade de desenvolver novos medicamentos (SOMERA, 2015).

O gênero *Staphylococcus* está associado a uma gama de doenças, sendo que aproximadamente 20 tipos de cepas causam infecções oportunistas. As principais espécies de interesse clínico são *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (TRABULSI, 2005). O *S. aureus* é uma espécie importante na clínica médica, pois apresenta grande potencial em desenvolver resistência bacteriana e causam diversas doenças como intoxicação alimentar, infecções cutâneas e septicemia. (XAVIER et al., 2007). Dentre as patologias causadas pelo *S. aureus*, podemos destacar: endocardite, pneumonia, osteomielite, bacteremia, meningite. E artrite bacteriana. Pacientes que sofreram trauma físico, com baixa imunidade ou que sofreram queimadura são os mais susceptíveis a infecção por esta bactéria. (SILVA et al., 2007).

S. pyogenes tem uma importância na prática médica devido à frequência e diversidade de infecções que pode causar. A bactéria adere e coloniza as células do trato respiratório e da pele, e pode causar doenças como faringotonsilite, piodermite, além de invadir tecidos e

desenvolver doenças sistêmicas como meningite, fasciíte necrosante e pneumonia. Esta bactéria também está intimamente relacionada ao desenvolvimento de doenças autoimune como febre reumática e glomerulonefrite aguda. A febre reumática tem um alto custo financeiro para o sistema de saúde em todo o mundo e suas sequelas ocasionam problemas socioeconômicos principalmente em países mais pobres (MUSSER et al., 2009).

Boucher et. al. (2009) estabelece um conjunto de microrganismos multirresistentes, dentre eles se destacam as bactérias *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. A capacidade de persistência no meio ambiente em condições adversas e o tratamento difícil são características comuns a todas elas. A permanência em ambientes hospitalares da espécie *A. baumannii* é um problema de saúde pública. Esta bactéria possui uma grande dificuldade de eradiação e é resistente a quase todas as classes de antimicrobianos, com crescentes taxas de resistência.

Pseudomonas aeruginosa é um dos principais agentes de infecção nosocomial em hospitais brasileiros, onde diversos estudos têm associado sua presença a uma disseminação clonal da espécie (KOKIS, 2005). A importância clínica da infecção por *P. aeruginosa* caracteriza-se pela expressão de múltipla resistência a antibacterianos associados a uma difícil erradicação da doença, conseqüentemente com elevados índices de morbidade e mortalidade (MENDES, 2005). Esse microrganismo pode apresentar resistência natural ou adquirida a grande número de antibióticos utilizados na prática clínica (VIEIRA et al., 2005). O intercâmbio de material genético, que ocorre de forma natural intra ou interespecies entre os bacilos Gram-negativos, é apontado como um dos responsáveis pela aquisição de determinantes de resistência. Assim, a capacidade que *P. aeruginosa* possui de tornar-se resistente durante o tratamento ao antibiótico é inerente à espécie e muitas vezes, inevitável (LINCOPAN; TRABULSI, 2008).

A espécie *Enterococcus spp.* compõem a microbiota intestinal de seres humanos e animais saudáveis e estão amplamente distribuídos no ambiente (RIBOLDI et al. 2009). As duas espécies mais importantes, *E. faecium* e *E. faecalis*, estão frequentemente implicadas em infecções em animais e humanos imunocomprometidos, como bacteremia, septicemia, infecções do trato urinário, infecções de feridas, meningites e endocardites (ZOU et al. 2011). Sabe-se que os *Enterococcus spp.* são propensos a sofrer seleção a cada administração de antimicrobiano, levando à formação de um reservatório animal de *Enterococcus spp.* resistentes, que podem infectar os seres humanos tanto por contato direto com animais como através da ingestão de alimentos de origem animal (VIGNAROLI et al. 2011).

Salmonella spp. é uma bactéria entérica que causa graves intoxicações alimentares, responsável por surtos registrados em vários países (SURESH, 2006). A sua presença em alimentos é um problema de saúde pública principalmente nos países em desenvolvimento pela dificuldade encontrada no diagnóstico, o que sobrecarrega ainda mais todo o sistema de saúde (FLOWERES, 2014). A principal preocupação é o surgimento de sorotipos do gênero *Salmonella* multirresistentes a antibióticos (TRABULSI, 2004). Após o diagnóstico de febre tifoide ou a febre entérica, o tratamento com antibacterianos deve ser iniciado prontamente e mantido pelo menos uma semana após a cessação da febre (MIMS, 2005). Antes da descoberta dos antibióticos, a taxa de mortalidade era de 10 a 15%; hoje essa taxa foi reduzida para menos de 1% (JAWETZ, 2006).

E. coli é uma bactéria gram-negativa responsável por causar infecções no trato urinário e bacteremia em pacientes hospitalizados (TIBA; NOGUEIRA; LEITE, 2009). É um habitante normal do trato intestinal de da espécie humana e animais e exerce um efeito benéfico sobre o organismo, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando uma considerável quantidade de vitaminas. Dentre as cepas de *E. coli*, entretanto, há um grupo capaz de provocar doenças em indivíduos humanos, coletivamente chamadas de *E. coli* enteropatogênicas. Essas cepas ocupam hoje o segundo lugar entre os principais agentes de doenças de origem alimentar nos Estados Unidos (OLSEN et al., 2000). A infecção por *E. coli* é geralmente transmitida por meio do consumo de água ou alimentos contaminados, tais como produtos de carne malcozida e leite cru.

As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são responsáveis por diferentes processos patológicos tanto em pacientes sadios quanto em pacientes imunodeprimidos (ANTUNES, 2006).

2.7 Resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana refere-se a cepas de microrganismos que são capazes de multiplicarem-se mesmo com o uso de antimicrobianos em doses maiores daquelas estabelecidas no tratamento em seres humanos (TAVARES, 2008). É uma preocupação mundial principalmente em ambiente hospitalar. Estudos mostram um aumento crescente de resistência bacteriana nos hospitais dos Estados Unidos, Europa e América Latina (ALVAREZ, 2006).

Existem bactérias extremamente resistentes a antibióticos, difíceis ou impossíveis de tratar com medicamentos existentes na prática médica, são as chamadas "superbactérias",

como por exemplo, a tuberculose resistente a medicamentos e o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). A resistência a antibióticos surge quando bactérias e fungos não morrem apesar do uso do remédio que normalmente seria capaz de eliminar ou paralisar seu crescimento, permitindo que esses microrganismos cresçam e se espalhem pelo organismo, apesar do uso do antibiótico (O'NEILL, 2016).

O primeiro caso de resistência antimicrobiana relatado foi em 1940, um caso de resistência ao uso penicilinas. A resistência a medicamentos causa várias dificuldades no tratamento de doenças, algumas bactérias apresentam resistência intrínseca a vários antibióticos usados na prática médica e podem sofrer mutações genéticas aumentando ainda mais os casos de resistências, podendo originar as chamadas “superbactérias”. Novas drogas são necessárias para o tratamento de infecções, principalmente em se tratando de microrganismos resistentes. Desenvolver antimicrobianos mais eficazes que possibilitem a prospecção de novas classes de moléculas naturais e/ou sintéticas capazes de inutilizar, de causar dano ao patógeno ou alterar geneticamente são opções para inibir o desenvolvimento de resistência (GIBBONS, 2005). A busca por novos agentes antimicrobianos é urgente devido aos úmeros crescentes de casos de resistência por agentes infecciosos e os efeitos colaterais dos antibióticos usados na medicina (BELLA CRUZ, 2010).

As doenças infecciosas estão presentes durante toda a história da humanidade e podem ser consideradas marcos históricos que alteraram a realidade do tempo em que ocorreram, como exemplos, têm a peste bubônica, tuberculose, malária e mais recentemente, a síndrome de imunodeficiência adquirida, todas elas causando um grande número de mortes em todo o mundo. No século XX ocorreu um avanço na descoberta de novos antibióticos, porém este sucesso no tratamento de infecções, já que rapidamente as bactérias desenvolveram mecanismos de resistência. Por isso, a resistência bacteriana é um fator preocupante, visto que os mecanismos de resistências desenvolvidos pelos patógenos estão cada vez mais complexos e causam prejuízos econômicos em todos os países do mundo (TENOVER, 2006). Pesquisas realizadas pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) demonstraram que as infecções hospitalares aumentam as taxas de mortalidade e o tempo de internação hospitalar (SILVA, 2007).

Após a segunda guerra mundial, a medicina evoluiu bastante e novos antibióticos surgiram no mercado, do final dos anos 40 até o início da década de 1970. Depois da década de 1980, essa taxa de novos antibióticos caiu bastante. (PAYNE, 2007). Observa-se que nas últimas décadas houve um grande aumento de infecções, contribuindo com o aumento da mortalidade em pacientes imunodeprimidos (CANTON; VIUDES; PEMÁN, 2001).

Em um relatório da ONU que trata do futuro da população mundial, indica que as mortes causadas pela resistência antimicrobiana podem chegar a 10 milhões por ano até 2050, o que causaria uma despesa cumulativa para a economia global de 100 trilhões de dólares (ONU, 2015). Este quadro é agravado pelo declínio de investimento tanto pela iniciativa privada quanto pelos órgãos públicos na pesquisa de novos antibióticos. Entre 2003 e 2013, foram realizados 38 bilhões de dólares em investimentos por fundos de capital de risco no Desenvolvimento & Inovação Farmacêutico (D&I). Desse total apenas 1,8 bilhão de dólares foram investidos em pesquisa de novos compostos antimicrobianos. (RENEWICK, 2016).

O uso de antibióticos pode ser considerado um dos maiores avanços da farmacoterapia. São as medicações mais largamente utilizadas, tanto em ambulatórios quanto em hospitais, e é responsável pela drasticamente diminuição da incidência de doenças infecciosas. Muitas doenças causadas por cepas multirresistentes permanecem sem opções terapêuticas efetivas: não há remédios na prática clínica moderna que erradiquem completamente esses microrganismos (TAVARES, 2008). O uso indiscriminado e abusivo de antibióticos e o fato das bactérias desenvolverem resistência natural e causar doenças oportunistas em pacientes imunodeprimidos tornam-se necessária as pesquisas para novos fármacos com potencial antimicrobiano. A concentração de uma substância necessária para inibir o crescimento de um microrganismo é conhecida como Concentração Mínima Inibitória (CIM), e determina a atividade antimicrobiana de extratos vegetais (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003). A ação antimicrobiana de extratos vegetais apresenta uma alternativa para o combate aos microrganismos patogênicos, levando assim a procura pela descoberta de novas moléculas químicas derivadas de espécies vegetais como fonte promissora de novos agentes antimicrobianos (SILVA, 2007).

2.8 Métodos para determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana geralmente é determinada através de ensaios *in vitro*. Os microrganismos usados podem ser cepas padrões ou isolados de materiais biológicos (RIOS; RECIO, 2005). Desde 1977, a Organização Mundial de Saúde (OMS) incentiva a pesquisa de produtos naturais com atividade antimicrobiana, principalmente contra microrganismos com resistência a medicações usadas na medicina tradicional. (BELLA CRUZ, 2010). Existem várias técnicas de triagem para estabelecer se o extrato de uma planta ou substância possui atividade antimicrobiana, desde as mais simples até as mais sofisticadas, indisponíveis em alguns laboratórios (ALVES et al., 2008). Os mais conhecidos são o método de difusão em

ágar, método de microdiluição e macrodiluição (OSTROSKY et al., 2008). Para determinar a atividade inibitória podem ser realizadas as técnicas de diluição em caldo ou em ágar. Os agentes antimicrobianos são testados em diluições seriadas, e a CIM é determinada pela menor concentração capaz de inibir o crescimento de um microrganismo (PHILLIPS, 1991; PIDDOCK, 1990).

Existem algumas maneiras de determinação da CIM de extratos de plantas e essa diferença se dá em decorrência de algumas variáveis como: a técnica aplicada, o microrganismo e cepas utilizadas no teste, local de origem da planta, época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas secas ou frescas e a quantidade de extrato testada. As CIMs são consideradas excelentes ferramentas para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos e é usada para julgar o desempenho de todos os outros métodos de susceptibilidade. Nos laboratórios, as CIMs são usadas como uma ferramenta de pesquisa para determinar a atividade *in vitro* de novos antimicrobianos (PHILLIPS, 1991; PIDDOCK, 1990). Vários fatores podem interferir nos resultados da determinação da CIM como exemplos têm-se a maneira de diluição do fármaco, o tipo de meio de cultura utilizado, a padronização do inóculo bacteriano e a temperatura de incubação (ALDERMAN; SMITH, 2001). A temperatura pode alterar a estabilidade dos agentes antimicrobianos, a fisiologia e metabolismo bacteriano e as bases genéticas de regulação e expressão gênica (MICHEL; BLANC, 2001). Sabe-se que isolados de uma mesma espécie bacteriana apresentam características distintas de crescimento *in vitro* de acordo com a adaptação em diferentes tipos de clima (ALDERMAN; SMITH, 2001).

Para que seja aceito no tratamento de patologias, os órgãos regulamentadores exigem que um novo composto seja tão eficiente quanto os que já estão disponíveis no tratamento tradicional. (BELLA CRUZ, 2010). Alguns critérios de CIM são utilizados para classificar a atividade antimicrobiana de extratos e/ou seus produtos de fracionamento, como por exemplo: CIM entre 10 e 100 µg/mL, é considerado como boa atividade antimicrobiana; entre 100 e 500 µg/mL como moderada; entre 500 e 1000 µg/mL como atividade antimicrobiana fraca; e quando maior que 1000 µg/mL como produtos inativos (MACHADO, 2009). Embora ainda seja um critério discutível, ele se baseia no fato de que a grande maioria dos antimicrobianos de uso clínico disponível apresenta atividade contra microrganismos sensíveis em concentração de até 10µg/mL (RIOS; RECIO, 2005), bem como também se leva em consideração que os extratos e frações de produtos naturais geralmente possuem composição complexa, e muitas vezes os compostos ativos estão presentes em quantidades muito pequenas (BELLA CRUZ, 2010).

A forma de como a preparação do extrato, fracionamento ou composto é obtido podem influenciar nos testes de atividade antimicrobiana. Isto se deve ao fato de que dependendo do tipo de solvente empregado para a obtenção dos extratos, bem como os procedimentos de extração e fracionamento utilizados, é possível se alcançar melhores índices de extração dos princípios ativos ou o contrário. Consequentemente isto interfere nos resultados da avaliação da atividade (COS, 2006). É importante lembrar que para os testes de atividade antimicrobiana os extratos, frações e compostos devem estar totalmente isentos de solventes utilizados durante sua obtenção, bem como também devem ser mantidos protegidos da luz, umidade e temperatura excessiva antes do teste (BELLA CRUZ, 2010). Vários fatores afetam a suscetibilidade do método de diluição e de difusão. Por isso, existe a necessidade do conhecimento das condições do experimento e a padronização rigorosa na execução do teste. Os aspectos relevantes a serem considerados são: disponibilidade de oxigênio, meios de cultura, pH, inóculo, condições de incubação, soluções diluentes, entre outras (ALDERMAN; SMITH, 2001).

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização, *International Standard Organization* (ISO) 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos e depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório. É necessário que novos produtos ou produtos de ação ainda desconhecida pela prática médica devem ter sua citotoxicidade analisada, primeiramente por meio de estudos *in vitro* de cultivo celular, seguidos de experimentos em animais e por último serem aplicados em humanos (FRESHNEY, 2000).

2.9 Família Malpighiaceae

As mais variadas famílias de plantas têm sido empregadas popularmente na região do Cerrado no tratamento de diversas doenças, entre elas estão as da família Malpighiaceae (SANO; ALMEIDA 1998). Esta família compreende aproximadamente 66 gêneros e 1200 espécies de árvores e lianas, sendo que 32 gêneros com aproximadamente 300 espécies (ARAÚJO, 1994) encontram-se distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais no Brasil (CRONQUIST, 1981), sendo uma das dez famílias mais bem representadas no Cerrado (MENDONÇA *et al.*1998), bioma que apresenta carência de estudos de anatomia vegetal, especialmente no que se refere aos frutos e sementes.

A morfologia das flores de Malpighiaceae é bastante homogênea, mas seus frutos possuem extrema diversidade (ANDERSON, 2018), ocorrendo frutos indeiscentes, secos e carnosos e frutos secos deiscentes, que podem ser alados ou não, glabros ou pilosos. Os frutos carnosos evoluíram separada e repetidamente em diversas épocas; acredita-se que isso ocorreu devido ao advento de pássaros pequenos, típicos dispersores destes frutos (ANDERSON, 2018). Com relação às sementes, nota-se que poucas espécies foram estudadas em detalhe. Singh (1964) referiu o estudo da estrutura seminal de *Malpighia glabra* L. e *Thryallisglauca* (Cav.) Kuntze, enquanto Corner (1976) relatou também a de *Heteroptery sangustifolia* Griseb. e *Tristellateia australasiae* A. Rich.

O fruto Murici (*Byrsonima sp.*) pertence à família Malpighiaceae, também conhecido como muricizinho, douradinha-falsa, orelha-de-burro, é um fruto típico do cerrado e pode ser consumido tanto in natura como processado em forma de sorvetes, geleias, picolés, entre outros e além do consumo este fruto também é utilizado como agente terapêutico, anti-inflamatório e cicatrizante (GUSMÃO et al., 2006). No Brasil diversos tratamentos gastrointestinais são realizados utilizando espécies deste gênero, estudos científicos relatam diferentes atividades biológicas destas plantas especialmente antioxidantes, antimicrobianos e atividades antiinflamatórias (GUILHON SIMPLICIO; PEREIRA, 2011). O gênero *Byrsonima* popularmente conhecido como murici possui galhos frágeis, troncos tortuosos, folhas, flores e frutos, o muricizeiro é uma árvore considerada de pequeno porte que cresce aproximadamente cinco metros de altura (MONTEIRO et al., 2015). O fruto Murici quando maduro possui, cor amarela e o odor de sua polpa se assemelham a um queijo rançoso frutado.

A composição química apresenta alto teor de água aproximadamente 76%, carboidratos 20%, lipídeos 3%, menos de 1% de proteínas e cinzas (MONTEIRO et al., 2015). Nos mercados da região amazônica, inúmeras plantas nativas são comercializadas com propósitos medicinais e alimentares, sendo usadas no preparo de sucos, geleias e licores no Norte e no Nordeste do Brasil. Os índios da Amazônia as utilizam no tratamento de doenças respiratórias e também como laxantes. O murici é famoso devido ao aroma exótico, sabor agridoce e polpa succulenta. No Nordeste brasileiro, as espécies deste gênero são comumente empregadas como antiasmáticas, antitérmicas e em infecções da pele (CACERES et al., 1993).

Figura 1: Fotografias representativas do Murici (*Byrsonima sp.*):
a) anteses florais e folhas, b), frutos maduros.

A



B



Fonte: Dados da pesquisa.

Já foram isolados do gênero *Byrsonima* alguns derivados flavonóidicos (*B.verbascifolia*), no entanto, são os triterpenos que representam a classe de substâncias naturais de ocorrência mais frequente no gênero (CANTRELL *et al.*, 1996). Em estudos farmacológicos, foram verificadas atividades bactericidas, antifúngicas, espasmogênicas e anti-protozoárias associadas aos triterpenóides (ácido betulínico e lupeol), flavonoides (hiperina), quercetina, sulfonoglicosídeo, esteroides aromáticos, aminoácidos e proantocianinas (FELÍCIO *et al.*, 1995). Em investigação fitoquímica do extrato metanólico de folhas de

B. crassa foram isoladas catequinas e glicosídeos flavonoidicos (SANNOMIYA *et al.*, 2004 e 2005).

Há inúmeras propriedades atribuídas ao caule e às folhas de *B. crassa* incluindo ação antiemética, diurética e tratamento de úlcera, gastrite e diarreia (SILVA *et al.*, 2001). Berger *et al.* (1998) relatou também a atividade tripanocida destas espécies. Heinrich (2003) também confirmou que a atividade antiespasmódica desta planta é devido a sua fração rica em flavonoides. Outras espécies, como *B. verbascifolia* apresentaram atividade antiviral (LOPEZ *et al.*, 2001). Investigações fitoquímicas de *B. crassifolia*, *B. microphylla* e *B. verbascifolia* revelaram a ocorrência de sulfonoglicolipídios, esteroides, triterpenos, ésteres aromáticos, aminoácidos e proantocianidinas (GOTTLIEB *et al.*, 1975; AMARQUAYE *et al.*, 1994; GEISS *et al.*, 1995; RASTRELLI *et al.*, 1997; MENDES *et al.*, 1999). A *Byrsonima coccolobifolia* possui ação moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* e bactericida para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* (CARDOSO, 2006).

2.10 Estabilidade dos produtos formulados a partir de extratos

A incorporação dos extratos vegetais em bases para fins de medicamento é uma prática bastante difundida, sendo de fundamental importância à escolha adequada da base à qual os princípios ativos de uso tópico serão incorporados, garantindo, assim, a estabilidade e absorção dos princípios ativos e, conseqüentemente, obtenção de seus efeitos farmacodinâmicos esperados. No cenário industrial, existem várias formas farmacêuticas para serem incorporados os extratos, destacando-se as formas farmacêuticas tópicas, como géis e cremes (emulsões), que são bastante utilizadas popularmente, possuindo uma boa aceitação pelos consumidores por apresentarem características sensoriais agradáveis, além de possibilitarem uma boa permeação cutânea de ativos (BUHLER; FERREIRA, 2008).

Os estudos de estabilidade devem ser realizados antes de disponibilizar os produtos ao consumo, requisito fundamental à qualidade e à segurança dos mesmos. Produtos expostos ao consumo e que apresentem problemas de estabilidade físico-química e/ou microbiológica, além de descumprirem os requisitos técnicos de qualidade, podem colocar em risco a saúde do consumidor e configurar infração sanitária. Pelo perfil de estabilidade de um produto, é possível avaliar seu desempenho, segurança e eficácia, além da sua aceitação pelo consumidor (BRASIL, 2012).

Conforme a Resolução Nº 45 da ANVISA, o teste de estabilidade é considerado um procedimento preditivo, baseado em dados obtidos de produtos armazenados em condições

que visam acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições de mercado. Embora todo procedimento preditivo não represente um resultado absoluto, possui uma ótima probabilidade de fornecer dados relevantes sobre o comportamento de um produto durante o seu armazenamento e utilização (BRASIL, 2012). Os Testes de Estabilidade Acelerada visam avaliar a formulação nas condições climáticas forçadas, em um curto período de tempo, para o envelhecimento acelerado, permitindo prever os perfis de estabilidade físico-química, microbiológica e funcional segundo os parâmetros específicos para cada forma farmacêutica (Baby et al., 2008).

É necessário que os testes sejam realizados em condições que seja possível fornecer informações sobre a estabilidade do produto em um menor tempo possível. Por isso, o material deve ser armazenado em condições que acelerem as mudanças que podem ocorrer durante o prazo de validade do produto. Estas condições não podem ser extremas a ponto de fugir da proposta original de simular uma aceleração do envelhecimento e não causar alterações que não aconteceriam no mercado. O Guia para obtenção do perfil de degradação em medicamentos considera que alterações dentro de limites determinados não seriam motivo para reprovar o produto. Este estudo indica o grau de estabilidade de uma medicação em variadas condições a que possa estar sujeito desde sua fabricação até sua validade (BRASIL, 2015).

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta e identificação do material botânico

As folhas da espécie vegetal *B. crassifolia* foram coletadas na área urbana do município de São Luís, Maranhão – Brasil (Latitude -2,4789 e Longitude -44,2106). A coleta foi realizada em outubro de 2015 entre 06h00min e 07h00min da manhã. Uma amostra da planta foi encaminhada à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Herbário Ático Seabra, para ser identificada e catalogada sob o número de registro 01084.

3.2 Obtenção do extrato etanólico (EE)

Para a obtenção do EE, as folhas de *B. crassifolia* foram limpas e secas à temperatura ambiente. Em seguida, foram trituradas e pesadas, obtendo-se 112g de material vegetal. Ao material triturado e pesado foi adicionada a quantidade de 336 mL da mistura hidroetanólica (70% de etanol 1:4 p/v) para a extração em frasco um hermeticamente fechado, ao abrigo de luz e em temperatura ambiente durante três dias, conforme metodologia de Matos (2009).

Com um funil de Buchner, a solução extraída foi filtrada a vácuo e o filtrado foi colocado em um evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura de 40°C. Posteriormente, o material concentrado foi colocado no freezer. Foi usado o Liofilizador da Liotop com temperatura de até -55° C, velocidade de 102m³/h, vácuo final de 3,7 microgramas de mercúrio.

3.3 Fracionamento por partição líquido-líquido

Foram obtidas frações de acetato de etila e hexânica através do extrato liofilizado das folhas de *B. crassifolia*, por meio de processo de partição líquido-líquido. 4g de extrato liofilizado resuspenso em 70 mL de uma solução de água e metanol (8:2) foram utilizadas para obtenção das frações. Inicialmente, a partição líquido-líquido foi feita por quatro vezes com hexano. A fase hexânica foi isolada da fase hidrometanólica pelo processo de decantação e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo. Posteriormente, foi liofilizada no Liofilizador da Liotop com temperatura de até -55° C, velocidade de 102m³/h, vácuo final de 3,7 microgramas de mercúrio. Em seguida, por quatro vezes a extração líquido-líquido foi realizada na fase hidrometanólica com acetato de etila, seguindo o procedimento anterior. A

fase hidroalcoólica restante foi concentrada em evaporador rotativo e liofilizada. As frações obtidas foram direcionadas para realização de testes (MENSOR, 2001).

3.4 Screening fitoquímico

No processo de obtenção de metabólitos secundários, o EE foi submetido à triagem fitoquímica inicial através de várias reações químicas. Estas reações podem ou não resultarem formação de precipitado e/ou mudança de coloração de acordo com cada classe de metabólitos. Foi usada a reação de Liebermann-Buchard para a identificação do grupo de esteroides e triterpenos; na classe dos fenóis e taninos foi usada a solução alcoólica de cloreto férrico; as classes de flavonóis, flavonoides, xantonas, cumarinas, leucoantocianidinas, catequinas e flavononas foram identificadas através da mudança de coloração do meio. A metodologia proposta por Matos (2009) é baseada na presença ou ausência das classes de metabólitos secundários e por isso, foi classificada como fortemente positivo (+++), positivo (++) , fracamente positivo (+) ou ausente (-). Os testes ocorreram no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica Universidade Federal de Pernambuco e no Laboratório de Fitoquímica e Fitoterapia do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão.

3.4.1 Teste para Taninos e Fenóis

Aproximadamente 3-4 mL do EE foram colocados em um tubo de ensaio. Posteriormente, foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico. Em seguida, a solução foi agitada e foi observada a formação ou não de precipitado ou qualquer variação na coloração.

Uma mudança da cor sem precipitado indicará fenóis; a formação de precipitado verde escuro será positiva para taninos condensados; presença de precipitado azul escuro indicará presença de taninos hidrolisáveis.

3.4.2 Teste para Flavonoides

Três tubos de ensaio foram utilizados, numerados de 1 a 3 com 4 mL de EE em cada. O primeiro tubo foi acidulado com solução ácida (4 gotas de HCL 1mol/L) pH 3, o segundo tubo foi acrescentado 20 gotas de hidróxido de sódio para alcalinizar o meio a pH 8,5 e o tubo

3 alcalinizado a pH 11 acrescentando-se com 24 gotas de base. Em caso de mudança na coloração para laranja a vermelha, o resultado será considerado positivo.

3.4.3 Teste para Cumarinas

Em um papel de filtro não fluorescente, com auxílio de um tubo capilar, foram aplicadas duas manchas com o EE de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro. Posteriormente, foi aplicada sobre uma das manchas 1 gota de solução alcoólica na concentração de 1mol/L de hidróxido de potássio. As manchas foram parcialmente cobertas com um cartão opaco não fluorescente e o conjunto Foi exposto à ação da luz UV durante dois a três minutos.

Ainda sob a luz UV, a parte encoberta foi descoberta e observado se havia modificação na fluorescência da mancha que foi alcalinizada. A presença de cumarinas é indicada pelo desenvolvimento de fluorescência em coloração verde forte, muito visível na metade que não foi encoberta da mancha alcalinizada.

3.4.4 Teste para Alcaloides

O resíduo do extrato seco foi dissolvido em 20 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) na concentração de 0,1 mol/L, e posteriormente foi aquecido durante 2 minutos. Em seguida, foi filtrado, resfriado e dividido em 3 tubos de ensaio. Foram gotejados os reativos específicos de Dragendorff, Mayer e Hager. Foi observada a formação de precipitado.

3.4.5 Teste para Triterpenos e Esteroides

O resíduo do extrato seco foi misturado e dissolvido completamente em 10 mL de clorofórmio. Em funil fechado com algodão coberto com alguns decigramas de sulfato de sódio anidro foi colocado acoplado em tubo de ensaio limpo e seco e a solução foi filtrada, gota a gota, Posteriormente, 1 mL de anidrido acético foi adicionado à solução, que foi agitada suavemente. 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado foram adicionadas e agitadas. Novamente foi observado o a mudança de coloração. A coloração azul seguida de verde será positiva para esteroides livres e a presença de triterpenos livres para colorações que variam do vermelho ao pardo.

3.4.6 Teste para Saponinas

A parte seca da reação anterior, insolúvel em clorofórmio, foi dissolvida em 10 mL de água destilada, e a solução foi filtrada em tubo de ensaio. Em seguida, o tubo foi agitado fortemente com a solução por 3 minutos para observar a formação ou não de espuma. A formação de espuma persistente e em bastante quantidade demonstra a presença de saponinas.

3.5 Atividade antioxidante

Utilizou-se o sistema de redução do radical DPPH para a análise da atividade antioxidante. Foi preparada uma solução, na concentração de 60 μM em MeOH com absorvância inicial de aproximadamente $0,62 \pm 0,02$ ($\lambda = 517 \text{ nm}$), à temperatura ambiente.

O EE foi misturado em MeOH na concentração de 20000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A partir dessa concentração inicial foram realizadas sucessivas diluições seriadas de acordo com a reatividade da mistura. As concentrações variaram de 40 a 360 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A mistura reacional na cubeta foi constituída pela adição de 1950 μL da solução do radical DPPH em 50 μL da amostra diluída em diversas concentrações com o objetivo de obter a curva de inibição. No controle negativo, a amostra foi substituída por metanol.

A absorvância foi medida no primeiro minuto da reação ($t = 1$) e a cada 5 minutos nos primeiros 20 minutos. Após os 20 minutos iniciais, foi feita a leitura em intervalos contínuos de 10 minutos, até o ponto final da reação, isto é, o tempo em que a absorvância se manteve constante (SILVA, 2010).

Foi calculada a porcentagem de inibição dos radicais DPPH[•] (I_{DPPH}) para cada amostra segundo a seguinte fórmula:

$$I_{\text{DPPH}} \% = \left[1 - \left(\frac{\text{AbsA}}{\text{AbsB}} \right) \right] \times 100$$

Onde: AbsA e AbsB são as absorvâncias da amostra e do controle negativo no final da reação respectivamente.

A atividade de sequestro do radical DPPH foi calculada também através da concentração mínima efetiva para reduzir a 50% da concentração inicial. Os valores da concentração das amostras *versus* a inibição foram usados para estipular os valores da CE_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), obtidos por regressão linear ($P < 0,05$).

3.6 Atividade Citotóxica

Para esse estudo, foram utilizadas linhagens de Adenocarcinoma de Mama (MCF-7), Carcinoma de Próstata (DU-145) e Fibroblasto de Pulmão Humano (GM) previamente obtida da Coleção Americana de cultura de células (ATCC). As células foram mantidas em RPMI a -80 °C em solução de congelamento. Para os ensaios *in vitro* as células foram descongeladas à temperatura ambiente e expandidas em frascos de cultura celular de 750 cm² (Corning Glass Workers, NY, EUA), à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂. Assim, ocorreu a proliferação das células que, progressivamente, colonizaram a superfície das garrafas, formando uma monocamada celular contínua.

A citotoxicidade do extrato foi avaliada utilizando-se o ensaio colorimétrico baseado no sal de tetrazólio, MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio) (MOSMANN, 1983). Para isso, as células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços e fundo chato a uma concentração de 1×10^6 células/mL, e incubadas por uma hora em meio RPMI, a 37 °C, com atmosfera contendo 5% de CO₂. Após esse período inicial de incubação, as células aderentes foram tratadas com diferentes concentrações dos triazenos. Após vinte e quatro horas, foi retirado o meio e adicionado uma solução de MTT (5 mg/mL), e após 3 h de incubação com o MTT foram acrescentados 100 µL de SDS a 10%, diluído em HCl (0,01 N). A quantificação foi medida a 540 nm em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax® Plus 384). Os resultados foram expressos em porcentagem de citotoxicidade celular, e esta foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidade} = (1 - (\text{Absorbância do teste} / \text{Absorbância do branco})) * 100$$

A citotoxicidade foi expressa em porcentagem e comparada e todos os dados obtidos foram comparados com o grupo controle negativo, constituído apenas de meio RPMI completo e células já citadas, e com o grupo controle positivo, ao qual fora acrescentado Triton X100 (1%).

3.7 Manipulação das formulações farmacêuticas

Os produtos foram manipulados segundo as fórmulas contidas no Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2012) para as bases de creme aniônico II (Lanette®), sabonete líquido e solução para uso tópico, com adaptações (tabela 1).

O processo de obtenção das formulações farmacêuticas obtidas a partir do EE das folhas de *B. crassifolia* teve o pedido de patente submetido ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob o N° BR 10 2017 009683 1 (Anexo A).

Tabela 1 – Solução tópica a 1% e 5% manipuladas à base do EE das folhas de *B. crassifolia*.

Solução tópica 1%	Solução tópica 5%
Glicerina 15%	Glicerina 15%
Propilenoglicol 15%	Propilenoglicol 15%
Álcool etílico 10%	Álcool etílico 10%
Extrato 1% (10mg/mL)	Extrato 5% (50mg/mL)
Água destilada q.s.p. 100 mL	Água destilada q.s.p. 100 mL

Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

Tabela 2 – Creme a 1% e 5% manipuladas à base do EE das folhas de *B. crassifolia*.

Creme 1%	Creme 5%
Glicerina 5%	Glicerina 5%
Água destilada q.s.p. 100 ml	Água destilada q.s.p. 100 ml
Álcool cetosteárilico e cetilesteáril sulfato de sódio (9:1) 5%	Álcool cetosteárilico e cetilesteáril sulfato de sódio (9:1) 5%
Óleo mineral 3%	Óleo mineral 3%
Cetiol 2,5%	Cetiol 2,5%
Extrato 1% (10mg/mL)	Extrato 5% (50mg/mL)

Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

Tabela 3 – Sabonete líquido a 1% e 5% manipuladas à base do EE das folhas de *B. crassifolia*.

Sabonete líquido 1%	Sabonete líquido 5%
Lauril éter sulfato de sódio 34%	Lauril éter sulfato de sódio 34%
Dietanolamina de ácido graxo de coco 1,5%	Dietanolamina de ácido graxo de coco 1,5%
Cocoamidopropilbetaina 5%	Cocoamidopropilbetaina 5%
Hidroxietilcelulose 0,5%	Hidroxietilcelulose 0,5%
Propilenoglicol 2%	Propilenoglicol 2%
Cloreto de sódio q.s.	Cloreto de sódio q.s.
Ácido láctico q.s.	Ácido láctico q.s.
Extrato 1% (10mg/mL)	Extrato 5% (50mg/mL)
Água destilada q.s.p. 100mL	Água destilada q.s.p. 100mL

Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

Todas as formulações foram manipuladas na quantidade de 100 mL e sem nenhum conservante, normalmente utilizados na constituição dos excipientes. O sabonete líquido teve

o pH ajustado para 4,5 com ácido lático, para que ficasse compatível com o pH cutâneo e da região íntima feminina. O ajuste do pH para as formulações de solução tópica e creme não foi necessário.

3.8 Controle de qualidade físico-químico das formulações farmacêuticas

Segundo a RDC 67/07 que dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiniais, devem ser realizados, no mínimo, os seguintes ensaios, de acordo com a Farmacopeia Brasileira ou outro Compêndio Oficial reconhecido pela ANVISA, em todas as preparações magistrais e oficinais líquidas não-estéreis: Descrição, aspecto, caracteres organolépticos e pH. Os testes de estabilidade acelerada, estudo projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento, foram realizados segundo o Guia para a realização de estudos de estabilidade de medicamentos" publicado pela ANVISA na RE 01, de 29 de julho de 2005, O bioproduto foi exposto as temperaturas de geladeira (4°C), ambiente (25°C) e estufa (40°C), durante seis meses e avaliadas no tempo zero, 30 dias, 90 dias e 180 dias, quanto às características organolépticas e Ph (BRASIL, 2005).

3.8.1 Teste de centrifugação

Foi selecionada uma amostra de 10g do produto manipulado em fase sólida e 10 mL dos produtos manipulado sem fase líquida. Foram adicionados em tubos de ensaio e submetidos ao teste de estabilidade pelo método de centrifugação. Neste teste, os tubos foram submetidos à rotação de 3.000 rpm (Fanem[®], Excelsa Baby I) por 30 minutos. Os testes foram realizados em triplicata.

3.8.2 Avaliações organolépticas

As amostras foram observadas a olho nu em duas etapas distintas, no intuito de verificar alterações de odor, cor e homogeneidade. A primeira foi no dia da elaboração das fórmulas e a segunda até 180 dias após o acondicionamento nas temperaturas de 5±2°C (Geladeira), 21±2°C (temperatura ambiente) e 37±2°C (em estufa).

3.8.3 Determinação de pH

A determinação do pH seguiu os seguintes passos: após elaboração da fórmula, foi utilizado o pHmetro para verificar o pH da formulação e o resultado. Em caso de o pH tivesse que ser corrigido, seria adicionado ácido láctico na formulação, em agitação leve. Novamente, seria verificado o pH no pHmetro até obter um pH ideal, no Tempo zero (T0) e após o acondicionamento por 180 dias nas temperaturas $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Geladeira), $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ (temperatura ambiente) e $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ (em estufa). Para essa análise, a amostra foi coletada diretamente dos produtos manipuladas

4.8.4 Determinação de viscosidade

Foi determinada a viscosidade através de um viscosímetro rotativo microprocessado (Quimis[®], Q860M21). Este teste permite mensurar força de torção convertida em viscosidade. A análise foi realizada por até 180 dias após o acondicionamento à temperatura ambiente; nesse caso, utilizando o *Spindle* (rotor 4) em e $23,6^{\circ}\text{C}$ e rotação de 30 rpm na porcentagem de leitura em 50% (desempenho considerado ótimo do fio de torção espiral). Esta é a faixa de leitura recomendada para anotar o valor de mPa.s (mili pascal por segundo).

3.8.5 Controle de qualidade microbiológico das formulações

Tanto os extratos quanto o bioproduto foram diluídos na proporção de 1:10 em solução NaCl 0.89%. Posteriormente, $1.000\mu\text{L}$ foram retirados de cada diluição e colocados em tubos contendo 9 ml de caldo Verde brilhante (Coliformes totais), caldo Lauryl e caldo *Escherichia coli* (caldo EC) (Coliformes termotolerantes).

Os tubos com o caldo Verde brilhante foram incubados em banho-maria a 37°C por 24 horas. Já os tubos contendo caldo EC foram incubados em banho-maria a $44,5^{\circ}\text{C}$ e realizado a leitura com 24 horas e 48 horas.

Os tubos contendo caldo Lauryl foram incubados em uma estufa bacteriológica a 35°C , durante 24 horas. O teste é positivo quando se observa a presença de turvação e formação de bolhas dentro do tubo de Durham presente nos tubos contendo os meios de cultura.

A técnica de Plaqueamento em Profundidade (“Pour Plate”) foi utilizada no intuito de determinar a contagem de microrganismos heterotróficos. Nesse caso, foi inoculado $1.000\mu\text{l}$

de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em meio PCA (Plate Count Agar). Os testes foram realizados em triplicata.

3.9 Atividade antimicrobiana: EE, frações e formulações

3.9.1 Seleção das cepas bacterianas

As amostras bacterianas foram obtidas no Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Federal do Maranhão. Foram utilizadas as seguintes amostras para a realização dos testes: microrganismos padrão (ATCC - *American Type Culture Collection*) *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. Foram utilizadas amostras de isolados clínicos: *Staphylococcus haemolyticus* (sangue) e *Salmonella spp.* (fezes), escolhidos a partir dos resultados obtidos previamente no teste de triagem.

3.9.2 Preparo das suspensões microbianas

Os microrganismos foram reativados e mantidos em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) a 35°C durante 24h. Em seguida, as amostras foram cultivadas em placas de Ágar Nutriente a 35°C por um período de 24 horas. Colônias isoladas foram ressuspensas em 3mL de solução fisiológica (NaCl 0.9 %) esterilizada até que fosse atingida uma turbidez equivalente na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) (CLSI, 2013).

3.10 Triagem pelo Método de difusão em Agar

Através da técnica da difusão em meio Müller Hinton, o potencial antimicrobiano do extrato do murici foi avaliado. Em seguida, os poços foram identificados, e adicionou-se com o auxílio de pipeta 30 μ L de cada uma das três formas (CLEELAND, 1991).

Cloranfenicol (0,01g/mL) foi utilizado como controle positivo. Como controle negativo, foi utilizado álcool 50% e o DMSO. Posteriormente, o material foi levado à estufa a uma temperatura de 35°C durante 24 horas. No dia seguinte, os halos formados foram medidos, em milímetros, com auxílio de um paquímetro.

3.11 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição.

A determinação da CIM foi feita através da técnica de microdiluição segundo a metodologia da diluição em caldo proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). As placas de 96 poços estéreis foram preparadas com 150µL de caldo BHI e 150µL do produto a ser testado seguido de diluições seriadas. Cada inóculo de bactéria será transferido para os poços e levados à estufa a 35°C por 24 horas. Após o período de incubação foi adicionado o revelador de crescimento microbiano resazurina a 0,1% e realizada a leitura após 4 horas de incubação (Palomino et al., 2002; Araújo; Longo, 2016; Estevam et al., 2016). A CIM é a menor concentração da solução onde não houve crescimento bacteriano visível.

3.12 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

As placas incubadas para determinar a CIM, são também utilizadas para determinar a CBM. Uma alçada de cada poço é colocada em placas contendo Agar Müeller Hinton e incubado por 24h a 35°C. A CBM é determinada pela menor concentração da solução onde não houve crescimento celular nas placas contendo ágar (99,9% de morte microbiana).

3.13 Avaliação da atividade hemolítica do extrato das folhas de *B. crassifolia*

3.13.1 Isolamento das hemácias (Preparo da suspensão de hemácias)

O sangue foi adquirido na EbeFarma e centrifugado durante 15 minutos a 3000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado e as hemácias foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) por mais 3 vezes e centrifugadas por 15 minutos a 3000rpm a cada lavagem, para retirada de traços de plasma e outras impurezas.

Em seguida, as hemácias foram ressuspensas em PBS acrescido com 10mmol/L de glicose a uma concentração de 8×10^9 cél./mL. A solução foi conservada a 4°C (WOLFGANG; PFANNENBECKER; HOPPE, 1987).

3.13.2 Avaliação da IC₅₀(50% de inibição de atividade hemolítica)

Foi preparado o extrato de *B. crassifolia* a uma concentração de 100 mg/mL (extrato/PBS). Diluições seriadas foram realizadas em 6 tubos contendo 1mL de PBS (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), em concentrações de 1% e 5%; tanto para o extrato quanto para a base usada na

elaboração de cada produto (sabonete líquido, solução e creme). Em seguida, foram adicionados 25L da suspensão de hemácias em 975 μ L de cada uma das diluições, com posterior homogeneização. Os produtos foram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Após esta etapa, as diluições foram centrifugadas durante 1 minuto a 10.000 rpm, o sobrenadante foi decantado em cubeta de 1cm e foi medida a absorvância no comprimento de onda de 540nm. O controle negativo foi feito com uma amostra diluída em PBS e o controle positivo foi realizado com o tubo totalmente lisado pela água destilada. (WOLFGANG; PFANNENBECKER; HOPPE, 1987).

3.13.3 Hemólise

As curvas dose-resposta referentes ao extrato foram elaboradas a partir dos dados coletados no estudo da IC50. Em seguida, foram incubadas as diluições hemolisadas com 25 μ L da suspensão de hemácias em PBS à temperatura ambiente por 10 minutos e com constante agitação. Posteriormente, as diluições foram centrifugadas por 1 minuto a aproximadamente 10.000 rpm e o grau de hemólise foi determinado no sobrenadante com a leitura a 540nm. A concentração efetiva que causa 50% de hemólise (H_{50}) foi calculada baseada nos resultados comparados com resultado do controle positivo. O teste foi realizado em triplicata (WOLFGANG; PFANNENBECKER; HOPPE, 1987).

3.13.4 Desnaturação

Foi preparada uma solução do extrato de *B. crassifolia* constituída de PBS na concentração de 10mg/mL. Foram adicionados 975 μ L desta solução em tubos e posteriormente acrescentado 25 μ L de suspensão de eritrócitos e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente com agitação constante. Após 10 minutos, foram centrifugadas durante 1 minuto a aproximadamente 10.000 rpm. O sobrenadante foi decantado em cubeta de 1 cm. Posteriormente, mediu-se a absorvância nos comprimentos de onda de 540 e 575nm. O controle negativo utilizado foi o extrato de *B. crassifolia* diluído em PBS. A absorvância medida a 575nm (α) foi dividida pela absorvância medida a 540nm(β), obtendo assim a proporção α/β . Esta razão foi utilizada para determinar o Índice de desnaturação da hemoglobina (ID) (WOLFGANG; PFANNENBECKER; HOPPE, 1987). A seguinte fórmula é utilizada para obtenção do Índice de Desnaturação (ID):

$$ID(\%) = (R_1 - R_i) / (R_1 - R_2) \times 100, \text{ onde:}$$

R_1 - proporção α/β da hemoglobina;

R_i - proporção α/β da substância-teste;

R_2 - proporção α/β do SDS a 0,1%.

A razão H50/ID será empregada para classificação do potencial irritativo do produto, conforme abaixo:

Faixa (H50/ID)	Classificação
>100	Não Irritante (NI)
≥ 10	Irritante Leve (IL)
≥ 1	Irritante Moderado (IM)
$\geq 0,1$	Irritante Severo (IS)
< 0,1	Irritante Máximo (IMax)

3.14 Toxicidade frente às larvas de *Artemia salina* Leach

O teste de toxicidade do EE frente às larvas *Artemia salina* foi feito segundo a metodologia proposta por Meyer (1982) adaptada por Ruiz et al., (2005). Os cistos de *A. salina* foram obtidos comercialmente e eclodidos nas condições preconizadas pela metodologia. Após eclosão e maturação até chegar à fase de metanúplio, realizou-se o teste utilizando diferentes concentrações do EE para calcular a DL_{50} , e classificar o seu nível de toxicidade. Os dados obtidos foram analisados pelo método de Probit (FINNEY, 1962).

3.14.1 Cultura das larvas de *Artemia salina* Leach

Um litro de solução salina sintética (60g de sal marinho/litro água destilada) foi colocado em um aquário. Foi acrescentado aproximadamente 80 mg dos ovos de *A. salina*. A temperatura foi controlada em 25°C e mantida aeração constante com auxílio de bomba de ar. O aquário é iluminado artificialmente por uma lâmpada de 100 W por 24-48h até a eclosão dos ovos. As larvas (náuplios) possuem fototropismo positivo e migram em direção à região mais iluminada. Em seguida, as larvas transferidas para um béquer contendo solução salina sintética e incubadas por mais 24h, sob as mesmas condições de iluminação e oxigenação, para que as larvas se desenvolvam para o estágio de metanúplio.

3.14.2 Preparo da amostra e determinação do valor da DL_{50}

Foi feito o teste para avaliar a letalidade de *A. salina*, 20 mg do extrato e da base usada na elaboração de cada produto e adicionou-se 20 μ L de DMSO, acrescentou salina artificial até o volume final de 2 mL. Essa diluição foi feita para obtenção de uma solução mãe de 10.000 μ g/mL e com uma concentração de 0,01% de DMSO. Amostras de 5, 50, 125, 250 e 500 μ L dessa solução mãe foram transferidas para frascos com 5 mL de solução final, obtendo-se concentrações de 10, 100, 250, 500 e 1000 μ g/mL, respectivamente. Dez larvas na fase metanúplio foram transferidas para cada um dos frascos. O controle negativo foi com 2 mL de salina sintética e 20 μ L de DMSO, e o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) foi o controle positivo. Após 24 horas de incubação, contaram-se as larvas vivas, considerando-se mortas aquelas que não se movimentaram durante a observação e agitação do frasco. Os testes serão realizados em triplicata. A DL_{50} será estimada a partir da regressão linear obtida da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração do extrato a ser utilizado (CARVALHO et al., 2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Rendimento do EE

Foram pesadas 112g de folhas secas e moídas com um rendimento de 11g de extrato liofilizado, isto é, um rendimento de 09,82%. Partiu-se de 4g do EE liofilizado para obtenção das frações e calculou-se o rendimento: hexânica 6,55% (0,262g) e acetato de etila 36,17% (1,447g). O extrato liofilizado apresentou um rendimento mais baixo quando comparado com rendimento obtido com a fração acetato de etila. Seriam necessários cerca de 10 quilos de folhas para obtenção de 1 quilo de extrato liofilizado e 2,857 quilos de extrato liofilizado para fornecer 1 quilo de fração acetato de etila.

4.2 Triagem fitoquímica do EE

Informações importantes acerca da presença de metabólitos secundários nas plantas são fornecidas através da análise fitoquímica, para que assim possa chegar ao isolamento de princípios ativos importantes na produção de novos fitoterápicos. A classificação é feita em negativo (-), positivo (+), moderadamente positivo (++) e fortemente positivo (+++). Neste caso, a análise fitoquímica do extrato mostrou a presença de Fenóis, Taninos condensados, Catequinas, Esteroides, Alcaloides, classificados como fortemente positivos e Flavononóis e Saponinas, classificados como moderadamente positivo, conforme mostrado Tabela abaixo.

Tabela 4 - Avaliação qualitativa e semi-quantitativa dos constituintes químicos no EE das folhas de *B. crassifolia*.

Constituintes Químicos	Avaliação
Cumarinas	-
Fenóis	+++
Taninos hidrolisáveis	-
Taninos condensados	+++
Antocianidinas e antocianidinas	-
Flavonas, flavonóis e xantonas	-
Chalconas e auronas	-
Flavanonóis	++
Leucoantocianidinas	-
Catequinas	+++
Flavononas	-
Triterpenoides	-
Esteroides	+++
Saponinas	++
Alcaloides	+++

Resultados expressos como média dos ensaios de avaliação qualitativa e semi-quantitativa de constituintes químicos realizados em triplicata no EE. Fortemente positivo = (+++); moderadamente positivo = (++); positivo = (+); negativo = (-).

Fonte: Elaborado pelo autor (2017)

Quanto ao extrato das folhas de *B. crassifolia*, no estudo fitoquímico preliminar obtiveram-se como metabólitos secundários fenóis, taninos condensados, flavanonóis, catequina, esteroide, saponina e alcaloides. Tendo-se como componentes majoritários os fenóis, os taninos condensados, catequinas, esteroides e alcaloides, representados por três cruces na tabela 4. As saponinas e flavanonóis foram consideradas moderadamente positivas, representadas por duas cruces. Os resultados negativos não implicam necessariamente na sua ausência, sendo possível que a quantidade dos mesmos esteja pequena para ser detectada. O estudo histoquímico é uma importante ferramenta para um direcionamento fitoquímico mais aprofundado, pois revelam as principais classes de metabólitos, possivelmente presentes numa estrutura celular (FANK-DE-CARVALHO, 2005).

Os compostos fenólicos são citados por Esau (1998) como um grupo heterogêneo de substâncias presentes em quase todos os tecidos vegetais. Os autores referem que os mesmos estão relacionados com a proteção ao dessecamento ou ao aparecimento e ataque de animais, embora haja dúvidas quanto a totalidade de suas funções. Os produtos químicos de defesa são produzidos em consequência da ativação de rotas específicas e constituem a maioria dos princípios ativos como: óleos essenciais, alcaloides, taninos e flavonoides (KRIVENKO *et al.*, 1989). Os dados de replicação por LC-MS corroboram com os de outros autores, como por exemplo, pela presença de flavonoides (RASTRELLI *et al.*, 1997), fenóis, esteroides (SANNOMIYA, 2004). A presença de flavonóides, fenóis e alcaloides foi evidenciada em estudos de Bejar (1995). Ainda, um estudo de Sannomyia *et al.*, (2015) revelou a ocorrência de esteroides, triterpenos, ésteres aromáticos, aminoácidos e proantocianidinas quando realizadas investigações fitoquímicas de *B. crassifolia* os autores Sannomyia *et al.*, (2015) *apud* Gottlieb *et al.*, (1975); Amarquaye *et al.*, (1994); Bejar *et al.*, (1995); Geiss *et al.*, (1995); Rastrelli *et al.*, (1997) e Mendes *et al.*, (1999) corroborando apenas com a presença de esteroides.

Estudos de Rastrelli *et al.*, (1997) sobre *B. crassifolia* relataram o isolamento de glicolipídeos, triterpenos, ácidos triterpênicos, catequinas e flavonoides das folhas e, proantocianidinas e taninos do tronco (GEISS *et al.*, 1995), estando de acordo com os achados obtidos neste trabalho quanto à presença de taninos, flavonoides e catequinas nas folhas do murici.

Os compostos fenólicos presentes no extrato como: Taninos condensados, Catequinas, Fenóis, estão vastamente distribuídos no reino vegetal, são constituídos por pelo menos um anel aromático cujo hidrogênio é substituído por uma hidroxila e estão associados a diversas atividades biológicas (SIMÕES, 2004). Os flavan-3-óis ou flavan-3,4-dióis, ou catequinas, derivados de flavonoides, originam os diversos tipos estruturais da classe dos taninos condensados, os quais são encontrados em diversas fontes, como o chá *Camellia sinensis*, açaí, cacau e barbatimão, dentre muitas outras, sejam plantas alimentícias ou medicinais (HERTOG; HOLLMAN; KATAN, 2013)

As catequinas que também foram encontradas no extrato do murici, sendo um dos metabólitos majoritariamente disponível na estrutura desta planta, têm sua importância na área microbiológica, pois alguns estudos já demonstraram que estas possuem atividade antibacteriana, como demonstra os estudos desenvolvidos por Schmitz (2005) que comprovam atividade antimicrobiana das catequinas. Segundo Schmitz (2005) existe uma relação direta entre a estrutura das catequinas e sua atividade antibacteriana. Estes autores

também citam que as catequinas com dihidroxilação nas posições 2 – 4 ou 2 – 6 do anel B e dihidroxilação nas posições 5 – 7 do anel A da estrutura das catequinas, apresentam atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA), porém não é possível afirmar neste estudo que as catequinas encontradas possuem tais estruturas, seriam necessários mais estudos experimentais para a elucidação das estruturas dos metabólitos encontrados nas folhas de murici.

No Nordeste brasileiro, ocorrem diversas espécies do gênero *Byrsonima*, havendo na literatura relatos que reportam a presença de triterpenos em *Byrsonima verbascifolia* e *Byrsonima microphylla*, e flavonoides e esteroides em *Byrsonima variabilis* (DAVID; SANTOS; GUEDES, 2003).

Os fenóis são considerados bons antioxidantes, pois estes compostos têm facilidade em perder um átomo de hidrogênio do grupo hidroxila no processo de transferência de um elétron e de um próton. Como a catequina é um polifenol oxida facilmente, ou seja, quando a mesma está presente no organismo e encontra um radical livre, logo reagirá com o mesmo evitando a oxidação de células saudáveis. O tanino dessa molécula é um melhor antioxidante do que somente o flavonoide da mesma, pois como ele é formado de três estruturas de catequina consegue reagir com três radicais livres ao mesmo tempo (VACCARI, 2009).

Dentre os compostos fenólicos, tem-se em abundância no extrato do muricis taninos estão relacionadas, principalmente, com suas propriedades adstringentes. A função biológica dos taninos tem sido investigada e acredita-se que eles estejam envolvidos na defesa química das plantas contra o ataque de herbívoros vertebrados ou invertebrados e microrganismos patogênicos. (SCALBERT, 1991). Por via interna os taninos exercem efeito antidiarreico e antisséptico; por via externa impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas subjacentes (BRUNETON, 1991). Quando se ingerem taninos presentes em alguns alimentos, que é o caso do vinho, sentimos um sabor adstringente, isto ocorre porque as catequinas e os demais taninos do vinho reagem com as enzimas salivares as inibindo e formando um complexo tanino/proteína. Os taninos condensados são capazes de reagir com as enzimas responsáveis pela catálise de transporte de nutrientes de algumas bactérias, quando esta reação acontece esta enzima torna-se inativa e, portanto, resulta na falta de nutrientes para a bactéria (VACCARI, 2009). Dentre as funções a que este se destina podemos destacar o efeito antidiarreico e antisséptico, e efeito antimicrobiano e antifúngico, além de cura em processos de feridas, queimaduras e inflamações (MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005). Estes compostos também são capazes de reagir com as enzimas responsáveis pela catálise de transporte de nutrientes de algumas bactérias. Quando

esta reação acontece esta enzima torna-se inativa e, portanto, resulta na falta de nutrientes para a bactéria. (UETA, *et al.*, 2014). Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico.

As propriedades antimicrobianas dos taninos são bem conhecidas e documentadas. Kilkuskie e colaboradores (1992) observaram que galotaninos mostraram atividade inibitória somente em concentrações tóxicas, elagitaninos e taninos condensados inibiram fracamente a replicação viral e os taninos complexos mostraram potente atividade contra a replicação do HIV. A atividade anti-HIV exibida por taninos é devida à inibição da transcriptase reversa, dificultando assim a replicação viral. Uma série de bactérias são sensíveis aos taninos, dentre elas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* e, em concentrações mínimas (0,5 g/L) (CASTRO et al., 1999).

Ademais, os taninos são hemostáticos e, como precipitam alcaloides, pode servir de antídoto em casos de intoxicações (BRUNETON, 1991). Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, podendo, logo abaixo dessa camada, o processo curativo ocorrer naturalmente (MELLO; SANTOS, 2001). Várias doenças degenerativas como câncer, esclerose múltipla, arteriosclerose e o próprio processo de envelhecimento estão associados a altas concentrações intercelulares de radicais livres. Estudos recentes mostram que vários taninos atuam como captadores de radicais, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis (MELLO; SANTOS, 2001).

Segundo Oloyede (2010), os alcaloides foram identificados como sendo um dos compostos majoritários do extrato do murici e possuem atividades antimaláricas, citotóxica e antimicrobiana.

As saponinas estão relacionadas com o sistema de defesa e são derivadas do metabolismo secundário das plantas e estão presentes principalmente nos tecidos mais suscetíveis ao ataque de insetos, fungos e bactérias (WINA; MUETZEL; BECKER, 2005). As saponinas podem se ligar aos esteroides e formar estruturas que apresentamefeitos de diminuir o colesterol,ação antifungicae sobre membranas celulares, alternando sua permeabilidade (SIMÕES, 2004).

Recentemente, Mors e colaboradores (2000), testaram várias substâncias naturais de diferentes classes, com histórico de neutralizar efeitos dos venenos de cobra. O teste realizado foi aquele do efeito antiletal sobre o veneno da Bothrops. Os autores observaram que substâncias amplamente difundidas no reino vegetal como o β - sitosterol, estigmasterol e 3 β - glicopiranosídeo de β -sitosterila, dentre outras, apresentaram 70% de proteção contra o efeito

antiletal deste veneno. A abundância de esteroides nos extratos da folha do murici pode justificar a ação antiofídica atribuída à espécie na medicina popular.

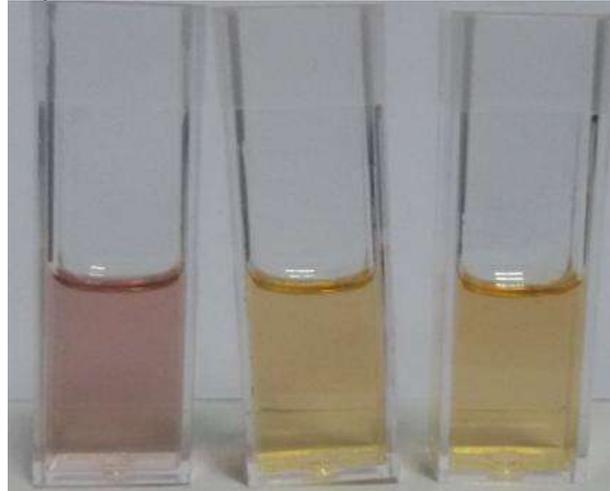
Constituintes químicos do extrato das folhas de *B. crassifolia* foram isolados no estudo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (LC-ESI-IT-MS). A quercetina (3,5,7,3'-4'- pentahidroxi flavona) é o principal flavonoide presente na dieta humana. Quercetina é um flavonoide natural que possui propriedades farmacológicas, tais como Antiinflamatória, anticarcinogênica, antiviral, influencia na inibição de cataratas em diabéticos, anti-histamínicas (antialérgicas), cardiovascular, entre outras atividades. A quercetina possui propriedades antioxidantes. Tem atividade cardiovascular, reduzindo o risco de morte por doenças das coronárias e diminuindo a incidência de enfarte do miocárdio. Grandes concentrações são encontradas em maçãs, cebolas, chá, brócolis e vinho tinto (NIJVELDT, 2001).

Estudos concluíram que flavonoide isoquercetina é capaz de promover uma significativa diminuição da proliferação das células tumorais por mecanismos envolvidos diretamente no ciclo celular (AMADO *et al.*, 2017)

De acordo com a literatura, um estudo utilizando a *B. cinera*, constatou-se que alguns flavonoides apresentam atividade antidiarreica como no caso da quercetina e ternatina. Essa atividade dos flavonoides foi observada através de experimentos de diarreia crônica em ratos e motilidade do trânsito intestinal de camundongos. Os dados obtidos neste trabalho mostraram-se relevantes, já que não há dados sobre a química ou efeitos farmacológicos de extratos das folhas no sistema gastrointestinal desta espécie na literatura. Esta atividade observada pode estar relacionada com a presença de catequinas e flavonoides nos extratos polares de *B. cinera* (RAO *et al.*, 1997; GALVEZ *et al.*, 1991; GALVEZ *et al.*, 1993; GALVEZ *et al.*, 1996). A abundância de quercetina no extrato do murici pode justificar a ação gastrointestinal atribuída à espécie na medicina popular.

4.3 Atividade antioxidante do EE das folhas de *B. crassifolia*

O sequestro do radical DPPH é bastante utilizado para avaliara evolução da atividade antioxidante de alimentos, extratos de plantas, óleos essenciais e substâncias puras (ABIDILLE, 2005). A redução do radical DPPH pelo extrato de *B. crassifolia* chegou ao nível de 42,1% na concentração de 0,076mg/mL, apresentando forte capacidade no sequestro desse radical para promoção da atividade antioxidante (Figura 2).

Figura 2: Verificação da atividade antioxidante do EE das folhas de *B. crassifolia*.

Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

A determinação da atividade antioxidante do extrato das folhas de *B. crassifolia* em diferentes concentrações está representada na tabela abaixo. Os resultados constataram que o percentual antioxidante e a concentração de extrato adicionada são grandezas diretamente proporcionais e atinge o valor máximo de $88,94 \pm 0,27\%$ de atividade antioxidante para a concentração de $360 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Nota-se uma concentração dependente, isto é, quanto maior a concentração do EE maior a capacidade antioxidante. A absorvância das soluções com extrato diminui à medida que o DPPH vai sendo consumido. Utilizando os valores dos controles e das amostras foi calculado os percentuais de inibição do DPPH pelo EE em diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de oxidação, ou seja, a porcentagem de atividade antioxidante é correspondente à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante.

Tabela 5 - Dados de Atividade Antioxidante (%) do EE das folhas de *B. crassifolia*.

EE($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Atividade Antioxidante (%)**					
	Tempo (min.)					
	1	5	10	15	20	30
40	12,90 \pm 2,13 ^{aA}	14,26 \pm 0,92 ^{aAB}	15,19 \pm 0,84 ^{aABC}	16,74 \pm 2,17 ^{aBC}	17,29 \pm 2,15 ^{aBC}	18,06 \pm 0,41 ^{aC}
120	20,80 \pm 0,28 ^{bA}	24,46 \pm 0,41 ^{bb}	27,71 \pm 0,38 ^{bC}	29,98 \pm 1,61 ^{bCD}	31,68 \pm 1,79 ^{bDE}	37,85 \pm 0,50 ^{bE}
200	38,85 \pm 0,89 ^{cA}	44,82 \pm 1,15 ^{cB}	49,22 \pm 0,10 ^{cC}	52,84 \pm 1,37 ^{cD}	60,32 \pm 1,27 ^{cE}	63,11 \pm 0,36 ^{cF}
280	45,06 \pm 0,54 ^{dA}	61,23 \pm 0,12 ^{dB}	70,40 \pm 1,10 ^{dC}	76,91 \pm 0,84 ^{dD}	80,70 \pm 0,74 ^{dE}	82,35 \pm 0,21 ^{dF}
360	37,60 \pm 0,90 ^{eA}	64,14 \pm 0,65 ^{eB}	75,19 \pm 0,38 ^{eC}	81,91 \pm 0,34 ^{eD}	84,98 \pm 0,09 ^{eE}	88,94 \pm 0,27 ^{eF}

** Valores médios \pm desvio padrão (n=3).

* Letras minúsculas iguais na vertical não diferem significativamente quanto à concentração pelo teste de Tukey, com 95% de significância.

* Letras maiúsculas iguais na horizontal não diferem significativamente quanto ao tempo pelo teste de Tukey, com 95% de significância.

Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

É importante destacar que para o cálculo dessa atividade antioxidante é necessária a utilização das leituras das absorvâncias dos controles negativos encontrados para cada

concentração analisada. Sendo assim, quanto maior a concentração da amostra e menor a absorvância, maior o consumo de DPPH. Constatou-se que a amostra com concentração de $360\mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato vegetal apresentou melhor consumo do DPPH e maior porcentagem de Atividade Antioxidante.

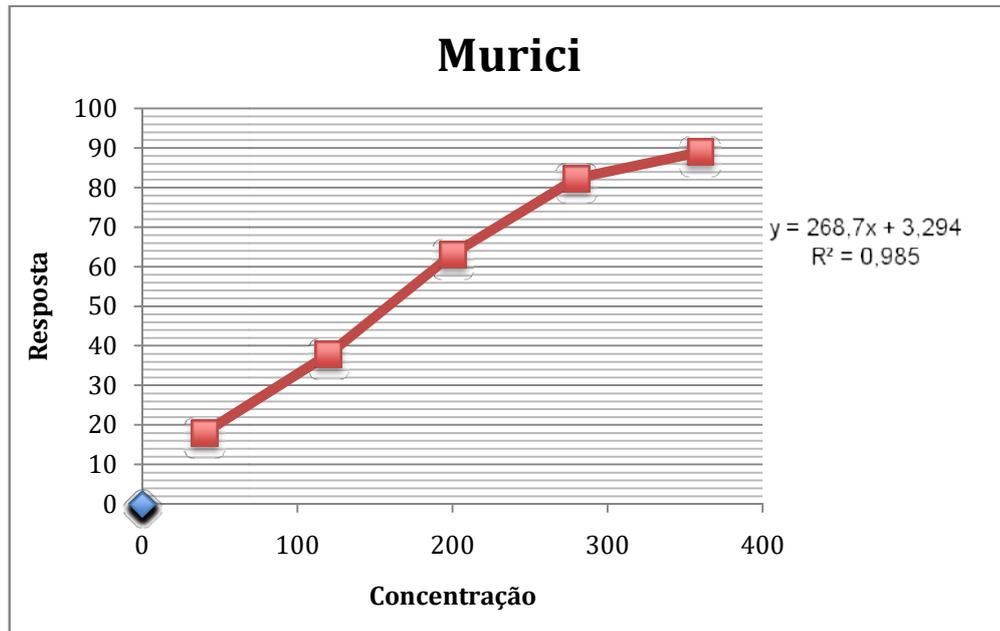
Foi observado que até a concentração de $360\mu\text{g.mL}^{-1}$, o consumo de DPPH foi diretamente proporcional à concentração da amostra, ou seja, com absorvâncias menores. Todas as amostras apresentaram capacidade de consumo de DPPH, visto que as absorvâncias após reação de DPPH com as diferentes concentrações das amostras testadas foram significativamente menores quando comparado com as absorvâncias obtidas para o controle negativo (DPPH +solvente), o que pode demonstrar preliminarmente a atividade antioxidante para o extrato testado (Gráfico 1).

Geralmente esta atividade tem sido correlacionada com a presença de flavonoides, classe está presente em todas as amostradas analisadas.

A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de extrato utilizada está representada no gráfico 1, e apresentou a equação da reta ($Y = 268,7x + 3,294$), com uma alta correlação dose-resposta ($R^2 = 0.9854$, $p < 0,0201$) fornecendo um mL^{-1} CE_{50} de $173,822\mu\text{g}^{-1}$, que é a concentração de extrato necessária para atingir 50% de atividade.

O extrato do murici apresenta em sua constituição compostos fenólicos como taninos, flavonoides e catequinas. Os fenóis e polifenóis possuem uma alta ação antioxidante (Simões, 2004), essas substâncias antioxidantes atuam minimizando danos pelas espécies reativas de oxigênio no organismo.

Gráfico 1 – Atividade antioxidante (%) por concentração do extrato (mg/mL) extrato de *B. crassifolia*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

Aragão, 2017, concluiu que as sementes de murici apresentam elevado teor de compostos bioativos, tais como compostos fenólicos, e elevada atividade antioxidante frente o método de redução do DPPH à atividade antioxidante. Verificou-se que o extrato aquoso, etanólico e metanólico apresentaram elevada atividade frente o método DPPH, com percentuais de varredura de 73,81, 82,73 e 84,2%, respectivamente, na concentração de 1mg/mL.

Scherer; Godoy (2009) considera que não existe uma avaliação da capacidade antioxidante universal para o método DPPH e por isso desenvolveu um procedimento padrão através da fórmula que expressa os resultados da capacidade antioxidante como "Índice de atividade antioxidante-(IAA)", que pode ser calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{IAA} = \text{Concentração final do DPPH} \cdot (\mu\text{g/mL}) / \text{CE50}(\mu\text{g/mL})$$

Scherer; Godoy (2009) considerou que as amostras em análise apresentam atividade antioxidante pobre quando IAA for menor que 0,5; atividade antioxidante moderada quando IAA estiver entre 0,5 e 1,0; atividade antioxidante forte quando IAA estiver entre 1,0 e 2,0, e atividade antioxidante muito forte quando IAA for maior que 2,0. O IAA mostrou-se adequado para a interpretação dos resultados da capacidade antioxidante de extratos de plantas e de compostos puros, sendo que não houve diferença significativa no IAA quando diferentes soluções e concentrações do DPPH e de várias substâncias foram utilizadas.

A atividade antioxidante do murici neste estudo foi de 0,876, portanto uma atividade antioxidante moderada.

Utilizando o método DPPH, Sánchez-Moreno (1998), classificou a capacidade antioxidante de alguns compostos fenólicos de acordo com o comportamento cinético, baseado no valor de TCE₅₀, como rápido quando o comportamento cinético for menor que 5 minutos, intermediário no intervalo entre 5 e 30 minutos, e lento quando é maior que 30 minutos. O tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio com a CE₅₀ é definido como TCE₅₀. Levando em consideração o valor do TCE₅₀, foi proposta uma fórmula para expressar a capacidade antioxidante de uma determinada substância, denominado de Eficiência Antiradical (EA), que pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$$EA = 1/CE_{50} T_{CE50}$$

O valor da EA foi utilizado para classificar a capacidade antioxidante em baixa (quando o valor do EA é menor que 1×10^{-3}), média (quando o valor do EA está entre 1×10^{-3} e 5×10^{-3}), alta (quando o valor do EA está entre 5×10^{-3} e 10×10^{-3}) e super alta (quando o valor do EA é maior que 10×10^{-3}). Uma das desvantagens dessa interpretação, é que o AE e o TCE₅₀ não foram totalmente definidos, sendo que o TCE₅₀ foi determinado a partir de um gráfico secundário que leva em consideração o tempo do estado estacionário e a concentração do antioxidante. Logo, pode existir uma grande variação nos valores de TCE₅₀, já que não há uma relação linear entre o tempo no estado de equilíbrio e a concentração do antioxidante (CHENG et al., 2006).

Mishra, Ojha e Chaudhury (2012) utilizaram quase o mesmo parâmetro estabelecido por Sánchez, mas não utilizou o valor da TCE₅₀ e obteve os resultados antioxidantes como *Antioxidant Reducing Power* (ARP), que pode ser calculada pela seguinte fórmula:

$$ARP = 1/CE_{50}$$

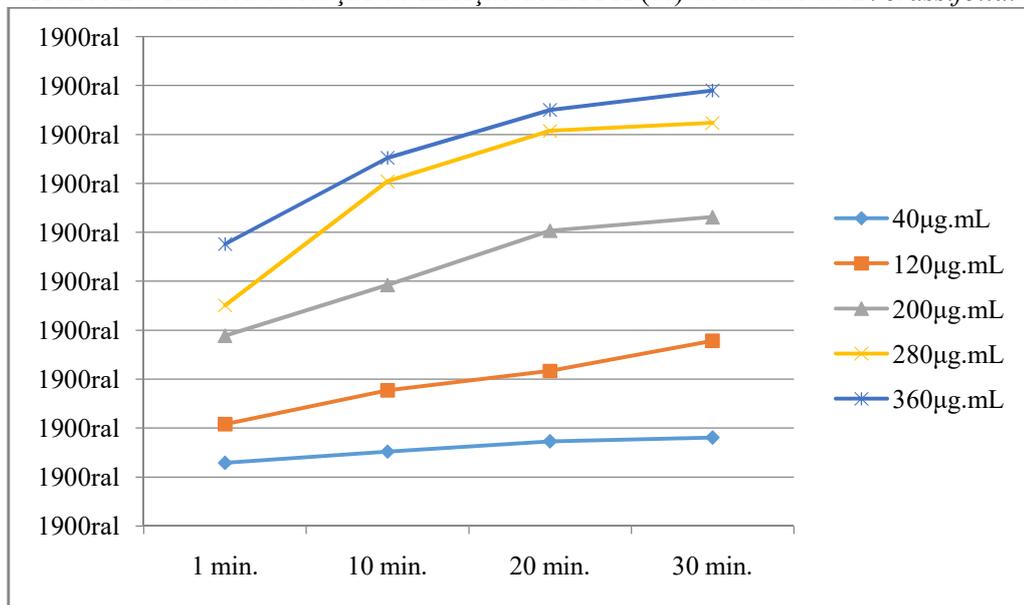
ARP é definido como o inverso da CE₅₀. Mishra, Ojha e Chaudhury (2012) também classificaram a capacidade antioxidante de determinados compostos considerando a cinética de reação do radical DPPH com o antioxidante, nas categorias de rápido (tempo de reação menor que 30 minutos), médio (tempo de reação entre 30 minutos e uma 1 hora) e lento (tempo de reação maior que 1 hora).

Neste estudo, o ARP do extrato do murici foi de $5,7 \times 10^{-3}$, portanto uma alta capacidade antioxidante. Sabe-se da capacidade antioxidante como efeito sinérgico. Este

efeito significa que as misturas de dois ou três compostos podem resultar numa maior capacidade antioxidante do que o apresentado por cada composto individualmente (Castro, 2006). Como neste estudo foi analisado o EE, esse efeito sinérgico pode estar supervalorizando a capacidade antioxidante.

O EE das folhas de *B. crassifolia* apresentou forte capacidade antioxidante nos primeiros 10 minutos de reação. As curvas cinéticas de degradação do radical DPPH nas diferentes concentrações do extrato das folhas de *B. crassifolia* em função do tempo de reação são representadas no gráfico 2.

Gráfico 2– Cinética da reação de inibição do DPPH (%) do extrato de *B. crassifolia*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

O EE das folhas de *B. crassifolia* apresenta uma cinética de reação classificada como intermediária, pois a finalização da reação de inibição do radical DPPH ocorre durante os 30 minutos de reação.

No teste da atividade sequestradora do radical DPPH, as maiores concentrações do extrato representaram uma melhor atividade antioxidante, o que caracteriza a presença no extrato de substância com potencial antioxidante. A correlação entre a concentração de fenólicos totais e atividade antioxidante tem sido amplamente estudada em alimentos, frutos e vegetais (JAYAPRAKASHA et al, 2008). Polifenóis têm sido relatados como sendo os responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos botânicos (MALLAVADHANI et. al., 2006). A grande correlação entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante nos testes utilizados, atividade sequestradora do radical livre indica que as substâncias fenólicas,

como os flavonoides que foram isolados neste estudo, são responsáveis pela boa atividade antioxidante desta planta.

4.4 Atividade Citotóxica:

Os resultados apresentados demonstram que o EE das folhas de *Byrsonima crassifolia* L não apresentou atividade citotóxica a linhagens de adenocarcinoma de mama e carcinoma de próstata e favoreceu a multiplicação celular. O EE apresentou atividade citotóxica à linhagem de células de fibroblasto de pulmão.

Gráfico 3 Percentual de citotoxicidade do extrato das folhas de *Byrsonima crassifolia* L. sobre célula tumoral (Carcinoma de Próstata - DU-145).

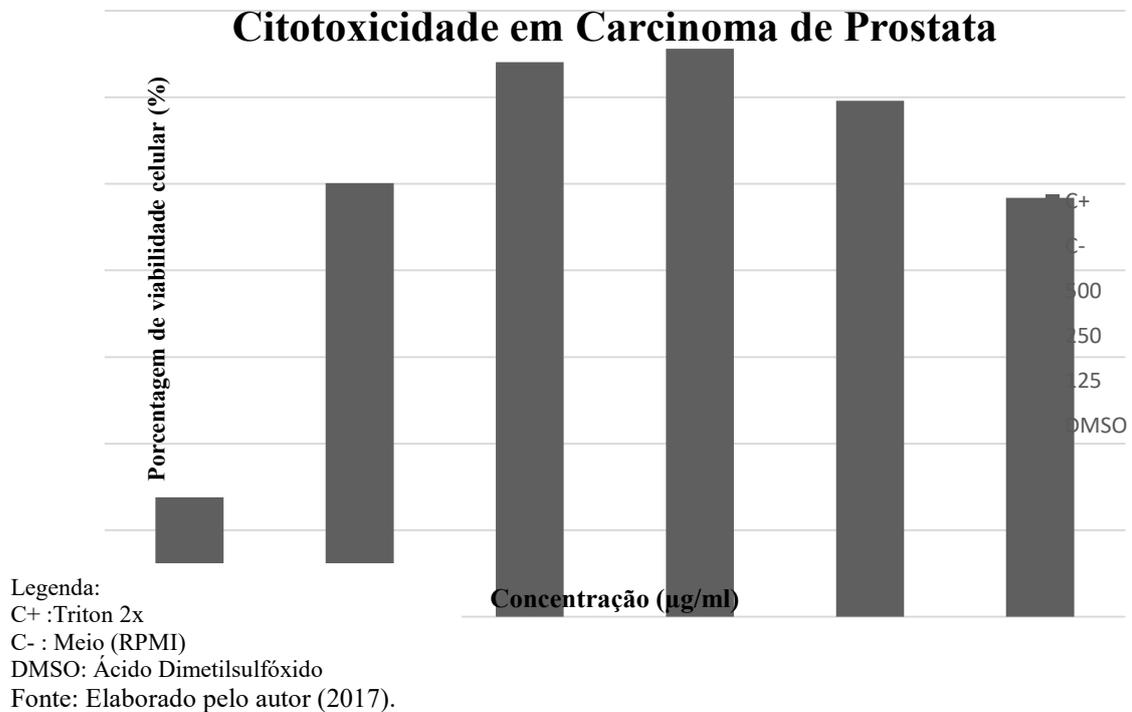
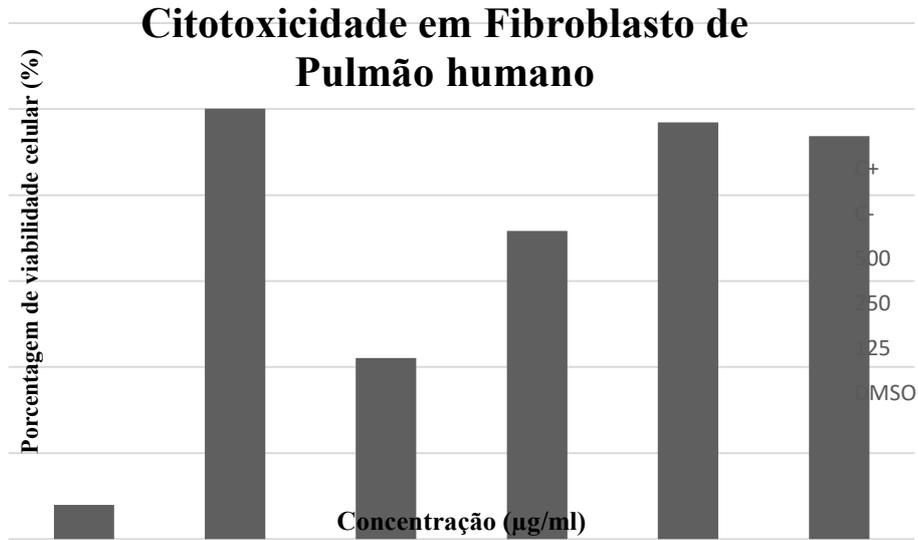


Gráfico 4 Percentual de citotoxicidade do extrato das folhas de *Byrsonima crassifolia* L. sobre fibroblasto de Pulmão Humano (GM).



Legenda:

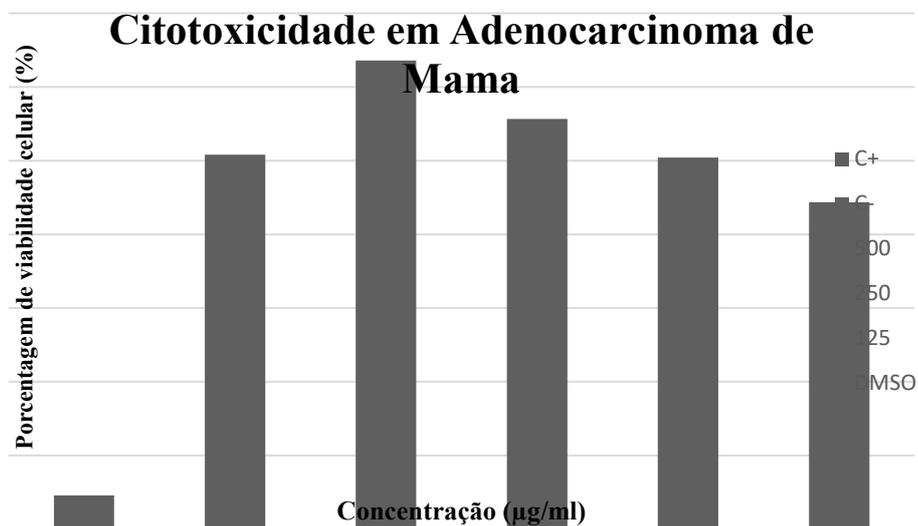
C+ : Triton 2x

C- : Meio (RPMI)

DMSO: Ácido Dimetilsulfóxido

Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

Gráfico 5 Percentual de citotoxicidade do extrato das folhas de *Byrsonima crassifolia* L. em células tumorais (Adenocarcinoma de Mama - MCF-7).



Legenda:

C+: Triton 2x

C-: Meio (RPMI)

DMSO: Ácido Dimetilsulfóxido

Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

Em geral, a citotoxicidade é diretamente proporcional à concentração da amostra e ao tempo de exposição (KUMAR et al. 2009). No presente estudo, esta proporcionalidade não foi observada.

Neste estudo, o extrato etanólico da *B. crassifolia* possui diferentes classes de substâncias como Fenóis, Taninos condensados, Catequinas, Esteroides, Alcaloides, classificados como fortemente positivos e Flavononóis e Saponinas, classificados como moderadamente positivo. Os flavonóides despertam interesse por sua comprovada atividade antioxidante e protetora (CAO et al. 1997), bem como por sua efetiva atividade antitumoral (FERRER et al. 2006).

Vários estudos comprovam que flavonoides como a apigenina, quercetina e canferol afetam o potencial transmembrana mitocondrial, com liberação do citocromo c ao citoplasma e ativação da procaspase-9, resultando em apoptose, na seguinte ordem de potencialidade: apigenina quercetina canferol em linhagens de células da leucemia (HL-60) tratadas com 60µmol/L destes flavonoides (KUNTZ et al. 1999). A atividade citotóxica dos flavonoides tem sido demonstrada em muitos trabalhos. SONODA et al. (2004) testaram dezessete flavonoides em leucemia humana (HL60), dentre eles, dez inibiram a proliferação das células leucêmicas in vitro. O composto 2',3',5,7 – tetrahidroxiflavona apresentou maior atividade (CI50 de 9,5 µM) seguido por apigenina, viscidulina III (5,2',6'-trihidroxi-7,8-dimetoxiflavona), wogonina (5,7-dihidroxi-8-metoxiflavona) e luteolina. GÁLVEZ et al. (2003) mostraram a atividade citotóxica da luteolina também em melanoma com CI50 de 10 µg/ml. Apesar de conter flavonoides, o EE testado não apresentou atividade citotóxica em células de adenocarcinoma de mama e carcinoma de próstata.

4.5 Teste preliminar estabilidade das formulações farmacêuticas

Após a manipulação dos produtos sabonete líquido, creme e solução tópica (Figura 3), foi analisado a estabilidade destas formulações farmacêuticas.

Figura 3 Formulações farmacêuticas manipuladas a partir do extrato das folhas de *B. crassifolia*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

As formulações mantiveram suas características iniciais após o teste de centrifugação, sem quaisquer alterações de coloração ou mudança de fase. O sabonete líquido obtido a partir das folhas de *B. crassifolia*, tanto a 1% quanto a 5% apresentaram variação do pH quando submetidos ao armazenamento em diferentes condições de temperatura. Foi possível observar que houve um aumento do pH na formulação de sabonete a 1%, onde, no T0 apresentou pH 4,5 que é o pH desejável para esta formulação. O sabonete líquido teve um aumento do pH para 5,0 e para 6,0, após 180 dias quando submetidos à temperatura de geladeira $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ e em estufa $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ respectivamente. Quanto às características organolépticas o sabonete permaneceu inalterado, como demonstram os resultados na tabela 6.

Tabela 6 – Avaliação organoléptica e determinação de pH no T0 (tempo zero) e até 180 dias da formulação do sabonete líquido de *B.crassifolia* a 1 e a 5% submetida a diferentes condições de armazenamento.

	Após elaboração (T0)		Após acondicionamento até 180 dias.	
	21±2°C (ambiente)	21±2°C(ambiente)	5±2°C (geladeira)	37±2°C (estufa)
Temperatura (°C)				
pH da formulação a 1%	4,5	5,0	6,0	6,0
pH da formulação a 5%	4,5	4,5	5,0	5,5
Características organolépticas 1%	Líquido homogêneo, com odor característico, coloração marrom claro, límpido.	Líquido homogêneo, com odor característico, coloração marrom claro, límpido.	Líquido homogêneo, com odor característico, coloração marrom claro, límpido.	Líquido homogêneo, com odor característico, coloração marrom claro, límpido.
Características organolépticas 5%	Líquido homogêneo, com odor característico, coloração marrom, límpido.	Líquido homogêneo, com odor característico, coloração marrom, límpido.	Líquido homogêneo, com odor característico, coloração marrom, límpido.	Líquido homogêneo, com odor característico, coloração marrom, límpido.

T0: Tempo zero (primeiras 24h de formulado); Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

O pH do sabonete líquido apresentou um aumento significativo no pH 4,5 a 6,0 quando submetidos a variação de temperatura, sendo que pH deve ficar em torno de 4 para a região íntima feminina. Ou seja, os resultados avaliados no período de 180 dias demonstraram que a relação entre as condições de temperatura interfere diretamente no pH das formulações.

O creme foi submetido a testes de estabilidade após o teste de estabilidade preliminar por centrifugação, onde foram avaliados o pH e as características organolépticas (cor, odor, aspecto). O creme obtido a partir das folhas de *B.crassifolia* a 1% e a 5% apresentaram pH 5,0 como sendo um valor desejável para esta formulação no T0 e 180 dias.

Após a elaboração, as amostras foram armazenadas em diferentes temperaturas. Foi colocado em temperatura ambiente, temperatura de geladeira 5±2°C pH 5,0 e estufa 37±2°C pH 5,5, permanecendo assim com o pH desejável para a formulação. Os resultados na tabela 7 mostram que o creme ficou inalterado quanto às características organolépticas.

As formulações farmacêuticas manipuladas apresentaram o pH entre 4,5-6,0, sendo compatível com a utilização na mucosa orofaríngea. Apresentou coloração amarelada, límpida e homogênea, e odor característico das sementes do extrato.

Os testes de estabilidades foram conclusivos, visto que foram realizadas avaliações em 30, 60, 90 e 180 dias após a preparação. Logo foi possível verificar que no tempo de 180 dias,

a formulação manteve seu pH e todas as suas características organolépticas, em todos os estados a que foi submetida, temperatura ambiente, geladeira e estufa.

Tabela 7 – Avaliação organoléptica e determinação de pH no T0 (tempo zero) e até 180 dias da formulação do creme de *B.crassifolia* a 1 e a 5% submetida a diferentes condições de armazenamento.

	Após elaboração (T0)		Após acondicionamento por até 180 dias.	
Temperatura (°C)	21±2°C (ambiente)	21±2°C(ambiente)	5±2°C (geladeira)	37±2°C (estufa)
pH da formulação a 1%	5,0	5,0	5,0	5,5
pH da formulação a 5%	5,0	5,0	5,0	5,5
Características organolépticas 1%	Cremoso (emulsionado), com odor característico, coloração marrom esverdeado.	Cremoso (emulsionado), com odor característico, coloração marrom esverdeado.	Cremoso (emulsionado), com odor característico, coloração marrom esverdeado.	Cremoso (emulsionado), com odor característico, coloração marrom esverdeado.
Características organolépticas 5%	Cremoso (emulsionado), com odor característico, coloração marrom esverdeado.	Cremoso (emulsionado), com odor característico, coloração marrom esverdeado.	Cremoso (emulsionado), com odor característico, coloração marrom esverdeado.	Cremoso (emulsionado), com odor característico, coloração marrom esverdeado.

T0: Tempo zero (primeiras 24h de formulado); Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

Houve uma pequena variação do pH nas formulações. Os cremes manipulados apresentaram pH entre 5,0 e 5,5. Este resultado mostra que o pH dos cremes é compatível com o pH de formulações para uso cutâneo, apesar da pequena variação.

Depois do teste de estabilidade por centrifugação, a solução tópica foi submetida a testes de estabilidade onde foram analisados o pH e as características organolépticas. A solução das folhas de *B. crassifolia* nas concentrações de 1% e 5% apresentaram pH 5,0, um valor desejável para esta formulação no T0. Houve uma diminuição do pH após 180 dias de armazenamento em temperatura ambiente na formulação a 1% (pH 5,0 para 4,0) e a 5% (pH 5,0 para 4,5) que foi a mesma variação para as formulações a 1% em temperatura de geladeira 5±2°C. Nas condições de temperatura de estufa de 37±2°C por 180 dias armazenamento, o pH foi 4,5.

Para a solução na concentração de 5%, quando armazenada em geladeira, o pH diminuiu de 5,0 para 4,5 e quando armazenada em estufa o pH foi de 5,0 após os 180 dias. A tabela 8 demonstra os resultados referentes às características organolépticas do creme, as quais permaneceram inalteradas.

Tabela 8 – Avaliação organoléptica e determinação de pH no T0 (tempo zero) e até 180 dias da formulação da solução tópica de *B. crassifolia* a 1 e a 5% submetida a diferentes condições de armazenamento.

	Após elaboração (T0)		Após acondicionamento por 180 dias.	
	21±2°C (ambiente)	21±2°C(ambiente)	5±2°C (geladeira)	37±2°C (estufa)
Temperatura (°C)				
pH da formulação a 1%	5,0	4,0	4,0	4,5
pH da formulação a 5%	5,0	4,5	4,5	5,0
Características organolépticas 1%	Líquido, homogêneo, com odor característico, coloração marrom.			
Características organolépticas 5%	Líquido, homogêneo, com odor característico, coloração marrom.			

T0: Tempo zero (primeiras 24h de formulado); Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

Os testes de atividade antimicrobiana e de determinação da concentração de polifenóis foram repetidos também com 30, 60, 90 e 180 dias e também não foram encontradas alterações significativas nas concentrações previamente determinadas. Após 180 dias os produtos mantiveram também as CIMs definidas inicialmente e o teor de polifenóis teve uma redução de 1% que justifica a manutenção dos resultados obtidos.

Em relação ao produto solução tópica, o pH variou entre 4,0 e 5,0, mesmo compatíveis com o pH cutâneo, pequena variação pode indicar instabilidades futuras (LEONARDI, 2005).

Aspectos dos produtos manipulados relacionadas ao pH devem ser compatíveis para não ocasionarem uma incompatibilidade química.: segurança do produto, estabilidade dos ingredientes da formulação e eficácia. Segundo a RESOLUÇÃO - RDC Nº 45 da ANVISA, altas temperaturas aceleram reações físico-químicas e químicas, o que pode ocasionar alterações em atividade de componentes, cor, viscosidade, aspecto e odor do produto. Temperaturas muito baixas podem acelerar alterações físicas como turvação, cristalização e precipitação.

Neste estudo, o produto sabonete líquido não apresentou estabilidade satisfatória quando armazenado em temperaturas $5^{\circ}\text{C} < T < 37^{\circ}\text{C}$ quando avaliado o pH. O creme não apresentou oscilações significativas de pH que o fizessem perder suas características quando submetido a temperatura maior que 37°C . Nas condições de temperatura testadas, o produto solução tópica não apresentou diminuição do pH após decorridos 180 dias de experimento.

O estudo do pH da formulação é de extrema importante uma vez que o pH do produto deve ser mantido durante seu prazo de validade, pois a alteração do pH pode significar alteração da estabilidade da formulação (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 2001).

A ausência de alterações no odor das amostras sugere a presença de antioxidantes nas formulações, já que odores podem ser resultados de reações de oxidação (BIANCO & LIMA, 2007).

Com relação ao teste de estabilidade, conforme Friedrich et al. (2007), é possível determinar o comportamento apresentado pelo produto ao término das condições de estocagem, permitindo, com isso, que se obtenha parâmetros iniciais e finais de comportamento. Neste teste, os resultados obtidos foram ausentes de qualquer sinal de separação de fases ou indícios de instabilidade, como coalescência, cremeação ou floculação (Prestes et al., 2009).

Estes estudos sobre a estabilidade acelerada de medicamentos são necessários, pois fornecem informações importantes sobre o comportamento das formulações frente a condições diversas no decorrer do tempo, garantindo, assim, a eficácia e a segurança dos produtos. A manutenção da estabilidade pode estar relacionada aos adjuvantes usados na formulação, como os conservantes, antioxidantes e acidulantes que proporcionam o aumento e a manutenção da estabilidade e aumentam o tempo de uso do produto mesmo diante de condições inadequadas de armazenamento, sem interferir na formulação nem causar reações indesejáveis ao consumidor. Essas substâncias impedem, retardam e previnem alterações químicas e microbiológicas, como o Edta, que remove metais pesados e minerais presentes na preparação, prevenindo processos de oxidação e os parabenos e imidazolidinilureia que atuam contra microrganismos presentes na formulação. Ao final, conclui-se que em condições normais de uso as amostras se mantiveram estáveis e sem alterações significativas dos parâmetros analisados, como pH, viscosidade, centrifugação, características organolépticas e contagem de microrganismos viáveis.

4.5.1 Determinação da viscosidade

Através do viscosímetro rotativo, a viscosidade do sabonete líquido foi avaliada 180 dias após a manipulação. Foi avaliada a formulação acondicionada em temperatura ambiente ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), a unidade de medida utilizada é o mili pascal segundo (mPa.s). A base do sabonete líquido apresentou 1.000 mPa.s, o sabonete a 1% apresentou 1.000 mPa.s e o sabonete a 5% apresentou viscosidade de 1.500 mPa.s.

Segundo Ferreira, 2010, a viscosidade adequada para sabonetes líquidos e xampus medido em viscosímetro rotacional, é de pelo menos 1.000 mPa.s. Para uma boa aceitação pelo consumidor, a viscosidade de xampus e sabonetes devem estar entre 1.000 e 5.000

mPa.s. A viscosidade é um fator muito importante no desenvolvimento de produtos cosméticos e está totalmente relacionada à aceitação do produto pelo consumidor final (CHORILLI, 2007).

Na avaliação da viscosidade aparente do sabonete líquido, observou-se, em linhas gerais, que as amostras na concentração de 1% e 5% apresentaram variações esperadas nesse parâmetro físico. Segundo Milan et al., 2007, a viscosidade de uma emulsão pode ser alterada pela composição de lipídios, pela proporção entre fase aquosa e oleosa, pela concentração de doadores de viscosidade e emulsionantes, assim como pela presença de polímeros. Porém, essa alteração na viscosidade não foi suficiente para a separação das fases no teste de centrifugação, sugerindo que a carga de tensoativos das emulsões foi eficaz para a manutenção da estabilidade física destas, mesmo com o aumento da concentração do EE do murici.

Estudos complementares, como estabilidade de prateleira, estabilidade frente a diferentes embalagens e doseamento de ativos, serão necessárias em avaliações futuras, a fim de se obter informações mais detalhadas sobre a vida útil dos produtos contendo extratos do murici.

4.5.2 Controle de Qualidade Microbiológico do extrato e formulações farmacêuticas.

Os padrões de qualidade microbiológicos do extrato, das bases e das seis formulações farmacêuticas foram realizados: Sabonete líquido a 1% e a 5%, Creme a 1% e a 5%, Solução de uso tópico a 1% e a 5%. Não foram observados contaminantes em nenhuma das formulações e no extrato de *B. crassifolia*.

Um dos principais fatores associados à contaminação microbiana de formulações originárias de plantas é devido ao mau tratamento da água, pois é o ambiente que mais proporciona o seu desenvolvimento (SILVA, 2014). A ausência de crescimento microbiano nas amostras indica boas práticas de manipulação adotadas no preparo das formulações segundo a RDC N° 67/07.

A água e os utensílios utilizados foram esterilizados previamente em autoclave a 121°C durante 15 minutos. A água utilizada foi à água purificada que segundo a Farmacopeia Brasileira é “a água potável que passou por algum tipo de tratamento para retirar os possíveis contaminantes e atender aos requisitos de pureza estabelecidos na monografia” (BRASIL, 2010). O controle empregado durante a manipulação do EE reflete na qualidade microbiológica do produto manipulado e isso pôde ser constatado pela ausência de

crescimento microbiano nas formulações, comprovando que o extrato atua como conservante dos produtos manipulados, sem ocorrer alteração da estabilidade da formulação.

Segundo a RDC nº 481/99 os limites de aceitabilidade de contaminação microbiológica para produtos que entrem em contato com mucosas:

- a) Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios totais, não mais que 102 UFC/g ou mL Limite máximo 5×10^2 UFC/g ou mL;
- b) Ausência de *Pseudomonas aeruginosa* em 1g ou mL;
- c) Ausência de *Staphylococcus aureus* em 1g ou mL;
- d) Ausência de Coliformes totais e fecais em 1g ou mL;
- e) Ausência de Clostrídios sulfito redutores em 1 g (exclusivamente para talcos).

Matérias-primas, água e pessoal são fontes importantes de contaminação microbiana e devem ser controlados.

Um estudo analisou produtos semiacabados (formulações farmacêuticas magistrais), ou seja, formulações-bases de cremes, loções e géis verificou-se que das 106 formulações analisadas, 2,83% estavam em desacordo com as especificações, portanto, 97,17% das amostras foram aprovadas (ANDRADE, 2005)

O extrato e formulações farmacêuticas manipuladas foram avaliados durante seis meses (tempo zero, 30 dias, 90 dias e 180 dias) em triplicata. Não houve turvação nos tubos utilizados para os testes e nem a formação de bolhas (gás) dentro do tubo de Durham presente no interior dos tubos contendo os meios em nenhum período analisado. Não houve crescimento de colônias nas placas de PCA (*Plate Count Agar*) e Sabouraud. Indicando ausência de crescimento microbiano em todos os testes. A ausência de crescimento microbiano no extrato hidroetanólicos das folhas de *Byrsonima crassifolia* comprova o controle empregado durante o preparo e armazenamento dos mesmos, possibilitando então a utilização destes para o preparo de formulações farmacêuticas manipuladas.

Os limites microbianos de produtos acabados podem se constituir em ausência absoluta de formas viáveis (produtos estéreis) ou sua presença em grandezas definidas, restritos ou não a determinadas cepas (SAFAR, 2012). A Farmacopeia Brasileira (5ª edição) indica os limites microbianos preconizados para produtos farmacêuticos não estéreis. Os limites aceitáveis para preparações de uso tópico estão contidos na tabela 9. As formulações farmacêuticas manipuladas apresentaram ausência de crescimento microbiano em todos os testes estando dentro dos limites microbianos especificados, a ausência desse crescimento comprova que a qualidade das matérias-primas e o controle empregado durante a

manipulação, refletem na qualidade microbiológica do produto.

Tabela 9- Limites microbianos para produtos não estéreis

Via de administração	Contagem total de bactérias aeróbias UFC/g ou mL	Contagem total de fungos/leveduras UFC/g ou mL	Pesquisa de Patógenos
Preparação uso tópico (oromucos, nasal, gengival, cutâneo, auricular)	10 ³	10 ²	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em 1g ou mL

10² UFC: valor máximo aceitável = 200, 10³ UFC: valor máximo aceitável = 2000. Fonte: ANVISA (2010)

4.6 Método de difusão do EE e da solução em Agar

Verificou-se atividade antimicrobiana da solução em meio sólido e todas as amostras bacterianas foram sensíveis ao EE, conforme tabela 10.

Tabela 10– Atividade antimicrobiana do EE das folhas de *B. Crassifolia* sobre bactérias pela técnica de difusão em Ágar.

Microrganismos	Extrato ¹	Halo de inibição (mm) CN ²	CP ³
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 13084879	24	0	40
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	20	0	40
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615	18	0	40
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	17	0	22
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	19	0	33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	18	0	22
<i>Salmonella spp.</i>	16	0	37
<i>Acinetobacter baumannii</i>	21	0	40

¹Atividade antimicrobiana do EE das folhas de *B. crassifolia* L.0,0768g/mL (mm); ²Controle Negativo - etanol 70% (mm); ³Controle Positivo Cloranfenicol 0,02 mg/mL (mm).

Fonte: Elaborado pelo autor (2016).

De acordo com Martins et al (2010) os extratos de plantas frequentemente possuem baixas propriedades de difusão, ressaltando que a técnica de diluição em caldo é a melhor maneira de estabelecer a real potência de um composto. Este fato não foi verificado com o extrato da folha do murici, visto que houve a formação de halo de inibição em todas as amostras testadas.

Estudos realizados por TORRES et al. (2000), concluiu que para o extrato da semente do murici não foi observado halo de inibição, tanto para as bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Embora, o extrato da casca tenha sido eficiente na inibição das bactérias Gram-negativas, o mesmo não impediu o crescimento da *L. monocytogenes*. Os extratos etéreos não apresentaram potencial antimicrobiano frente às bactérias Gram-negativas

avaliadas, uma vez que não foi observado halo de inibição. Para as bactérias Gram-positivas, dentre os extratos etéreos, aquele obtido a partir da semente do murici apresentou o maior halo de inibição (12,33 mm), para o crescimento de *L. monocytogenes*. Porém, este mesmo extrato não foi capaz de evitar o crescimento de *S. aureus*, ao passo que os extratos etéreos da casca e polpa foram eficientes na inibição deste microrganismo. O fato de extratos obtidos a partir de um mesmo solvente, porém utilizando diferentes partes do fruto apresentar atividade de inibição microbiana sugerem que existam mais de um componente com ações antimicrobianas presentes no murici (TORRES et al.,2000).

De maneira geral, os extratos de murici apresentaram um maior potencial antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas. Isso pode ser explicado pela composição das membranas celulares das bactérias. As bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana celular mais complexa, devido à presença de lipopolissacarídeos. Assim, geralmente essas bactérias são menos suscetíveis a ação de agentes inibidores de crescimento, ou seja, são mais resistentes à ação de agentes antimicrobianos (PINHO et al., 2012). Esse fato também foi constatado por GELLEN & SILVA (2016), que avaliaram a atividade antibacteriana de extrato aquoso de murici frente às bactérias Gram positivas e Gram-negativas e observaram que os extratos não foram capazes de inibir o crescimento de *Escherichia coli*. PINHO et al., (2012) também não observaram inibição frente a este microrganismo quando avaliaram os extratos hidroalcoólico das folhas de alecrim, pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi.

Extratos que apresentam halos de inibição entre 8 a 13 mm são considerados extratos com poder de ação moderadamente ativos, já halos de inibição maiores que 14 mm são extratos muito ativos (ARBOS; STEVANI; CASTANHA, 2013). Em nosso estudo, todos os halos de inibição do extrato da folha do murici foram maiores que 14 mm e por isso classificado como um extrato muito ativo frente a todas as amostras testadas.

4.7 Atividade antimicrobiana do EE a partir das folhas de *B.crassifolia* (Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima)

O extrato apresentou ação bactericida forte para todas as cepas testadas, ou seja, foi capaz de causar morte dos microrganismos e os valores de CIM estavam entre 2,4 e 19,2 mg/mL e CBM entre 19,2 e 38,4 mg/mL. A menor CIM encontrada foi de 2,4 mg/mL para *Enterococcus faecalis*; seguido de 4,8mg/mL para *Pseudomonas aeruginosa*; 9,6 mg/mL *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella spp*; e 19,2mg/mL para *Staphylococcus aureus* (Tabela 11).

Tabela 11 - Atividade antimicrobiana do EE a partir das folhas de *B. crassifolia*. Halo de inibição (mm).

Microrganismo	CIM ¹	CBM ¹	CN ²	CP ³
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	9,6	19,2	-*	40
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	19,2	38,4	-	38
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615	9,6	19,2	-	40
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	2,4	19,2	-	22
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9,6	19,2	-	34
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	4,8	19,2	-	20
<i>Salmonella spp.</i>	9,6	19,2	-	35
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	9,6	19,2	-	40

(-*) ausência da atividade antimicrobiana; (¹) CIM e CBM do extrato em mg/mL obtido a partir das folhas de *B. crassifolia* a 50mg/mL; (²) CN – Controle Negativo – álcool a 70%.

Fonte:Elaborado pelo Autor (2017).

A concentração inibitória mínima para extratos vegetais não é consensual na literatura. Uma das classificações propostas por Duarte, 2006, sugere alguns critérios apresentados na Tabela 12.

Tabela12 – Classificação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais segundo Duarte (2006).

CIMs DO EXTRATO	RESULTADO
Até 5 mg/ml	Inibição alta
Entre 6 e 15 mg/ml	Inibição moderada
Acima de 16 mg/ml	Inibição baixa

Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

Seguindo esse critério, o extrato das folhas de *B. crassifolia* apresenta uma atividade inibitória alta para *E. faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*; uma atividade inibitória moderada para o *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*e uma atividade inibitória baixa para o *Staphylococcus aureus*.

Extratos vegetais que apresentam CIM's muito altas são mais difíceis de utilização como medicação para tratamento de infecções bacterianas (BASTOS, 2016). Portanto, infere-

se que o EE das folhas do murici tem potencial farmacêutico no tratamento doenças bacterianas.

Sabe-se que além da ação do extrato das folhas do murici, os extratos aquosos de raízes de *B. crassifolia* têm ação antimicrobiana sobre as bactérias, evidenciando, assim, que o seu uso na medicina popular contra algumas infecções acometidas por *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (GELLEN; SILVA, 2016).

As amostras de bactérias usadas nesta pesquisa são de interesse clínico devido seu potencial patogênico a seres humanos e difíceis de erradicar devido à sua resistência aos antibióticos. Os resultados deste estudo demonstram que o EE das folhas de *B. crassifolia* possui atividade antimicrobiana tanto para bactérias gram-positivas quanto gram-negativas. O crescimento de casos de bactérias multirresistentes é justificado pelos altos índices de resistência, tornando necessária a implementação de medidas de vigilância, isolamento e racionalização do uso de antibióticos a fim de que sejam minimizados os casos de resistência antimicrobiana e diminuir a disseminação desses patógenos (TAKEUCHI, 2005; MARTINS; BARTH, 2013; FRANCO, 2017).

4.8 Atividade antimicrobiana das frações acetato de etila, hexânica e aquosa a partir das folhas de *B. crassifolia*

As frações aquosa, hexânica e acetato de etila do EE foram testadas. A fração acetato de etila apresentou melhor atividade antimicrobiana com CIM entre 0,6 e 9,6 mg/mL e CBM de 12,5mg/mL (Tabela 13).

A menor CIM da fração acetato de etila foi de 0,6 mg/mL para *Pseudomonas aeruginosa*. Para as amostras de *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* a CIM foi de 2,4mg/mL. O resultado de 4,8 mg/mL foi encontrado para *Staphylococcus aureus* e 9,6 mg/mL para as amostras de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Salmonella spp.* A fração acetato de etila apresentou CBM de 19,2 mg/mL para todos os microrganismos testados exceto para *Enterococcus faecalis* e *Acinetobacter baumannii* onde não foi constatado ação bactericida. Os resultados encontram-se na tabela abaixo.

Tabela 13 Atividade antimicrobiana das frações Hexânica, Acetato de Etila e aquosa obtidas a partir do EE de *B. crassifolia*.

Microrganismo	Acetato de etila		Hexânica		Aquosa		
	CIM ¹	CBM ¹	CIM ¹	CBM ¹	CIM ¹	CBM ¹	CN ²
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	9,6	19,2	1,2	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	4,8	19,2	4,8	-	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	9,6	19,2	4,8	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	2,4	-	4,8	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,4	19,2	1,2	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,6	19,2	0,6	-	-	-	-*
<i>Salmonella spp.</i>	9,6	19,2	2,4	-	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	-	-	-	-	-	-	-

(-) ausência da atividade antimicrobiana; (¹) CIM e CBM das frações em mg/mL obtidas a partir de *B. crassifolia* a 50mg/mL; (²) CN – Controle Negativo – álcool etílico a 70%. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2017).

Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

A fração hexânica não apresentou ação bactericida frente às amostras analisadas. A fração aquosa não apresentou atividade microbiana e todas as frações não apresentaram atividade frente *Acinetobacter baumannii* (tabela 13). A fração hexânica apresentou CIM entre 0,6e 4,8 mg/mL. A menor CIM da fração hexânica foi de 0,6 mg/mL para *Pseudomonas aeruginosa*, para *Staphylococcus haemolyticus* e *Escherichia coli* a CIM encontrada foi de 1,2 mg/mL, 2,4 mg/mL para a *Salmonella spp.* 4,8 mg/mL para *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*.

A atividade antimicrobiana obtida da fração acetato de etila obtida a partir das folhas de *B. crassifolia* são superiores as da fração aquosa e hexânica. Tal resultado provavelmente está relacionado com a presença de compostos fenólicos nesta fração, já que Karling et al. (2017) realizaram um fracionamento líquido-líquido do bagaço de uva e obteve um elevado teor de compostos fenólicos e constatação de atividade antioxidante na fração acetato de etila.

Melo (2019) mostrou a cessação do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em extratos obtidos com acetato de etila com CIM de 0,54 mg/mL e 0,85 mg/mL para *Candida albicans* e as bactérias *Enterococcus faecalis*, respectivamente. Para as amostras de *Salmonella entérica* e *Escherichia coli* a CIM variou de 1,0 mg/mL a 2 mg/mL. Observou-se a inibição dos microrganismos. Para as outras amostras utilizadas, os valores variaram de 0,44 mg/mL a 2 mg/mL, sendo o acetato de etila os de melhor resultado.

As frações do EE de *B. crassifolia* não tiveram atividade antimicrobiana frente *A. baumannii*, o que não ocorreu com o EE. Este resultado pode estar relacionado com sinergismo entre os constituintes químicos presentes no EE e ausente nas diferentes frações de *B. crassifolia*.

O *Acinetobacter baumannii* raramente causa infecções em indivíduos hígidos. Este microrganismo normalmente infecta pessoas hospitalizadas que foram submetidos a procedimentos invasivos; pacientes portadores de câncer e pacientes imunodeprimidos como transplantados ou em uso de corticoides. Esses pacientes ficam hospitalizados por tempo prolongado e utilizam antimicrobianos de amplo espectro. O aumento do tempo de internação pode estar associado ao sítio da infecção e ao perfil de suscetibilidade do microrganismo (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; FALAGAS; KARVELI; KELESIDIS, 2007; MAK; KIM; PHAM, 2009).

Um estudo mostrou que mortalidade associada à sepse por *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos (CRAB – *Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii*) foi de 34,8%. Tal trabalho foi realizado em um hospital terciário e também demonstrou que os custos e de tempo de hospitalização dobraram em indivíduos com infecções associados ao *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos quando comparado ao grupo controle (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

4.9 Atividade antimicrobiana das formulações farmacêuticas manipuladas a partir do EE das folhas de *B. crassifolia*

O creme manipulado a 1% apresentou CIM de 5 mg/mL para o *Acinetobacter baumannii*. O sabonete a 1% apresentou CIM de 5 mg/mL para o *Acinetobacter baumannii* e *S. aureus*. A solução tópica a 1% apresentou CIM de 5 mg/mL para o *Acinetobacter baumannii* e CIM de 2,5 mg/mL para as amostras de *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *P. aeruginosa* e *Escherichia coli*.

O sabonete e o creme na concentração de 1% apresentaram concentração bacteriostática. A solução tópica apresentou CBM de 5 mg/mL para as amostras de *Streptococcus pyogenes* e *Escherichia coli* (Tabela 14).

Tabela 14- Atividade antimicrobiana do sabonete líquido, creme e solução para uso tópico a 1% manipulados a partir do extrato de *B. crassifolia*.

Microrganismo	Sabonete 1%		Creme 1%		Solução tópica 1%		CN ²
	CIM ¹	CBM ¹	CIM	CBM	CIM	CBM	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	5	*	-	-	2,5	-	*
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	5	-	5	-	5	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615			-	-	2,5	5,0	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	2,5	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922					2,5	5,0	-

(*) ausência da atividade antimicrobiana; (1) CIM e CBM do creme em mg/mL obtidas a partir de *B. crassifolia* a 1% (10mg/mL); (2) CN – Controle Negativo – base do creme, Controle Positivo Cloranfenicol 0,02 mg/mL (mm). Fonte: Elaborado pelo autor (2017).
Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

O creme manipulado a 5% a partir do EE das folhas de *B. crassifolia* apresentou CIM entre 1,56 e 25 mg/mL e CBM de 12,5 mg/mL para *Acinetobacter baumannii*. Os melhores resultados de CIM's foram de 1,56 mg/mL para *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*. Para as outras amostras, o sabonete líquido apresentou ação bacteriostática.

O sabonete líquido a 5% a partir do EE das folhas de *B. crassifolia* mostrou CIM entre 3,12 e 25 mg/mL. Os melhores resultados de CIM's foram de 3,12 mg/mL para *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Acinetobacter baumannii*. Para todos os microrganismos utilizados no teste o sabonete líquido apresentou ação bacteriostática.

O creme a 5% elaborado a partir do extrato das folhas de *B. crassifolia* apresentou CIM entre 1,56 e 12,5 mg/mL. Os melhores resultados de CIM's foram de 1,56 mg/mL para *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus haemolyticus*. Apresentou CIM de 12,5 mg/mL para *E. faecalis* e *E. coli*. Para todos os microrganismos utilizados no teste o creme apresentou ação bacteriostática.

A solução tópica a 5% elaborado a partir do extrato das folhas de *B. crassifolia* apresentou CIM entre 3,12 e 25 mg/mL. Os melhores resultados de CIM's foram de 3,12 mg/mL para *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus haemolyticus*. A solução tópica apresentou atividade bactericida com CBM de 12,5 mg/mL para *Enterococcus faecalis* e CBM de 25mg/mL para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e

Acinetobacter baumannii. Para as demais amostras, o sabonete líquido apresentou ação bacteriostática.

Os dados da tabela 15 mostram que a solução para uso tópico manipulada a 5% a partir do extrato das folhas de *B. crassifolia* apresentou CIM entre 1,56 e 25 mg/mL. As menores CIM's foram de 1,56 mg/mL para *Streptococcus pyogenes* seguido de 3,12 mg/mL para *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*. As CBM's foram de 12,5 mg/mL para *Enterococcus faecalis* e 25 mg/mL para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Acinetobacter baumannii*.

Tabela 15- Atividade antimicrobiana do sabonete líquido, creme e solução para uso tópico a 5% manipulados a partir do extrato de *B. crassifolia*.

Microrganismo	Sabonete 5%		Creme 5%		Solução tópica 5%		
	CIM ¹	CBM ¹	CIM	CBM	CIM	CBM	CN ²
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	3,12	-	1,56	-	12,5	12,5	-*
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,12	-	-	-	3,12	25	-
<i>S. haemolyticus</i>	3,12	-	1,56	-	3,12	25	-
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	3,12	-	-	-	12,5	25	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	6,25	-	12,5	-	3,12	12,5	-
<i>Salmonella spp.</i>	12,5	-	-	-	25	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12,5	-	12,5	-	12,5	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	25	-	-	-	25	-	-

(-*) ausência da atividade antimicrobiana; (1) CIM e CBM do creme em mg/mL obtidas a partir de *B. crassifolia* a 5% (50mg/mL); (2) CN – Controle Negativo – base do creme, Controle Positivo Cloranfenicol 0,02 mg/mL (mm). Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

A solução de uso tópico teve uma maior ação bacteriostática e bactericida do que o creme e o sabonete, já que ela apresenta CIM e CBM menores que as demais e é capaz de causar a morte de alguns microrganismos. Essa atividade mais efetiva da solução tópica pode ser relacionada à melhor difusão das moléculas ativas que compõe o EE do que os constituintes da base da solução tópica.

Migliato et al. (2009), avaliou o extrato glicólico das cascas de *Dimorphandra mollis* Benth (faveiro) pela técnica de difusão em ágar. Foi manipulado o sabonete líquido nas concentrações de 8% e 20% com e sem conservante (triclosan). O sabonete manipulado com conservante apresentou atividade antimicrobiana, já o sabonete manipulado sem conservante, não apresentou ação contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Lopes, Santos e Tomassini (2005) analisaram quatro formulações que continham extrato etanólico dos frutos de *P. angulata* L. (Camapu) a 25%: sabonete líquido, loção

cremosa, desodorante antisséptico e gel de limpeza. O sabonete líquido, o desodorante e o gel apresentaram atividade bacteriostática pelo ensaio de inibição em placa frente a *S. aureus* ATCC 6538, já a loção cremosa não apresentou resultado satisfatório. Somera (2015) sugere que o possível efeito antibacteriano encontrado na avaliação do sabonete líquido contendo 7,5% de extrato glicólico de flores de *T. patula*, testado em cepas de *S. aureus*, é decorrente do sinergismo entre as substâncias polifenólicas encontradas nas flores de *T. patula*.

Todos os produtos manipulados não possuem adição de conservante a fim de evitar qualquer influência na atividade antimicrobiana das formulações

4.10 Avaliação da atividade hemolítica do extrato das folhas de *B. crassifolia*

A concentração do extrato necessária para causar 50% de hemólise (H_{50}) em hemácias sadias é denominada de IC_{50} . A razão H_{50}/ID é denominada índice de desnaturação (ID) e possibilita classificar o produto quanto ao seu potencial irritativo. Os valores, para o extrato, estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 16- Valores das H_{50} , dos ID e da razão H_{50}/ID do extrato das folhas de *B. crassifolia* e das bases.

Amostra	Experimento	H_{50} mg/ml	ID(%)	H_{50}/ID	Classificação: <i>In vitro</i>
<i>B. crassifolia</i>	1	>100	N.D	N.D	NI
	2	>100	N.D	N.D	NI
	3	>100	N.D	N.D	NI
Sabonete*	1	>100	N.D	N.D	NI
Creme*	1	>100	N.D	N.D	NI
Sol. Tópica*	1	>100	N.D	N.D	NI

H_{50} - dose efetiva que causa 50% de hemólise; ID – Índice de Desnaturação; N.D – Não determinado; H_{50}/ID – razão utilizada para classificação do potencial de irritação; NI – Não Irritante; *Bases das formulações farmacêuticas.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Com base nestes resultados, não foi possível determinar o ID (%) e razão H_{50}/ID , pois o extrato e as bases não apresentaram atividade hemolítica que provocasse lise em 50% das hemácias, mesmo concentrações altas.

Sabe-se que alguns tipos de saponinas apresentam atividade hemolítica e isso faz parte do sistema de proteção dos vegetais contra o ataque de fungos, bactérias, insetos e vírus, estão diretamente ligados a atividade antifúngica e antibacteriana (ARAÚJO; FARIA; SAFADI, 2014). A análise fitoquímica do extrato mostrou saponina em sua composição. Dentre os metabólitos secundários, os alcaloides, mesmo em pequenas quantidades, são substâncias

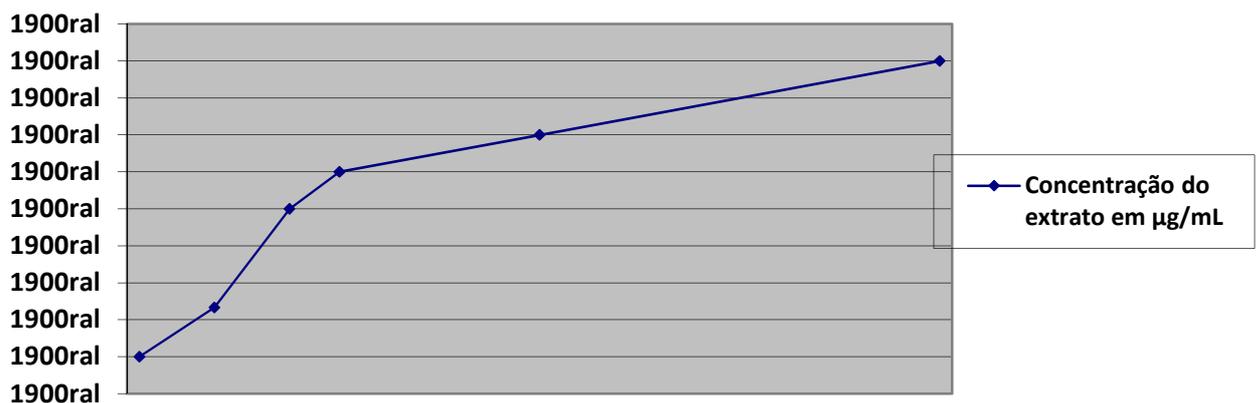
naturalmente tóxicas (DEWICK, 2002). A habilidade dos taninos, principais constituintes químicos da folha do murici, de interagir com proteínas e outras macromoléculas lhe conferem atividades tóxicas, e aglutinantes (MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005).

Os alcaloides, as saponinas e os taninos constituintes do EE não apresentaram atividade hemolítica nas concentrações testadas. Por isso, é possível inferir que será necessária uma concentração maior que 100mg/mL para causar lise nos eritrócitos. O EE foi enquadrado entre as substâncias não irritantes baseado na classificação apresentada por WOLFGANG; PFANNENBECKER; HOPPE (1987).

4.11 Toxicidade frente *Artemia salina* Leach.

Os resultados do teste com o extrato de *B. crassifolia* frente *A. salina*, mostrou a relação de organismos (vivos e mortos) no final do ensaio. A dose letal para 50% dos náuplios foi de 199,6µg/mL e a mortalidade de 90% das larvas de *A. salinas* e deu a partir da concentração de 1000 µg/mL O controle negativo (salina sintética e DMSO) não produziu mortalidade das larvas (gráfico 6).

Gráfico 6– Porcentagem náuplios de *Artemia salina* morta em relação às concentrações do extrato de *Byrsonima crassifolia*.



Mortalidade da *Artemia salina* (%) X Concentração do extrato em µg/mL.
Fonte: Elaborado pelo autor (2017)

Os extratos são classificados com base nos níveis de CL₅₀ frente *A. salina*; os extratos com DL₅₀ ≤ 80 µg/mL são classificados como altamente tóxicos, valores de 80 µg/mL < CL₅₀ < 250 µg/mL são considerados moderadamente tóxicos e CL₅₀ > 250 µg/mL indica baixa

toxicidade ou atóxicos (Dolabela, 1997). Nesta classificação, o extrato de *B. crassifolia*, que possui uma DL_{50} de 199,6 μ g/mL, é considerado moderadamente tóxico.

Segundo a classificação proposta por Meyer et al., (1982), a amostra é considerada tóxica quando apresentam $DL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ e atóxicas ou inativas as que apresentarem $DL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$. Conforme esta classificação, o extrato de *B. crassifolia* é considerado atóxico.

Tabela 17 - Toxicidade do extrato de *B. crassifolia* frente às larvas de *A. salina*.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	10	100	250	500	1000	Fonte: Elaborado pelo autor (2016)
LOG	1	2	2,4	2,7	3	
% MORT	10	23,33	60	70	90	

A infusão das folhas de *B. crassifolia* apresentou DL_{50} de 3614 $\mu\text{g/mL}$ que, foi comparado com os valores de referência da Organização Mundial de Saúde, indicando que o mesmo é atóxico, visto que só são considerados tóxicos valores de DL_{50} abaixo de 1000 mg/mL. (DEGEN et al., 2016).

Costa Júnior, (2013), determinaram a toxicidade às frações acetato de etila ($IC_{50} = 129,0 \mu\text{g/mL}$) e diclorometano ($IC_{50} = 24,89 \mu\text{g/mL}$), obtidas a partir do extrato das sementes de *P. isnignis* frente *A. salina*, essas mesmas frações apresentaram atividade frente à *Leishmania amazonensis* e em testes realizado com células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês (V79), os resultados mostram que ambas as frações são ligeiramente citotóxicas em concentrações até 100 $\mu\text{g/mL}$.

Compostos com $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ no ensaio de letalidade a *A. salina* são considerados bioativos ativos e potencialmente citotóxicos contra linhagens de células tumorais (MCLAUGHLIN, 1991), inseticida e anti-*Trypanosoma cruzi* (ALVES, 2000). Segundo esta classificação, o extrato da folha do murici seria considerado um bioativo inativo e sem potencial citotóxico contra linhagens de células tumorais.

A utilização da *A. Salina* em estudos toxicológicos preliminares deve-se a simplicidade com que pode ser manuseado. A rapidez e o baixo custo favorecem a utilização em diversos estudos. Ensaio de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral podendo estimar a concentração média letal (CL_{50}) (LUNA, 2005).

Segundo MEYER, et al. (1982) foi estabelecido uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL_{50} , de extratos de plantas sobre microcrustáceos *Artemia Salina*, considerando que quando verificados valores acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e não havendo

morte acima de 50%, estes, são considerados atóxicos. Diversos trabalhos vêm tentando correlacionar a toxicidade sobre *Artemia Salina* com atividades antifúngica, viruscida, tripanossomicida e parasiticida. O extrato da folha de *B. crassifolia* possui uma DL₅₀ de 199,6µg/mL e, portanto, considerado tóxico. Foi constatada atividade antimicrobiana e, portanto, os resultados estão de acordo com Meyer, 1982. Testes futuros são necessários para verificar a atividade antifúngica, viruscida, tripanossomicida e parasiticida.

5 CONCLUSÃO

- Na análise fitoquímica, o EE de *B. crassifolia* foi classificado como fortemente positivo para fenóis, taninos condensados, catequinas, esteroides, alcaloides e moderadamente positivo para flavononóis e saponinas.
- A capacidade de redução do radical DPPH pelo EE de *B. crassifolia* chegou ao nível de 42,1% na concentração de 0,076mg/mL, apresentando forte configuração no sequestro desse radical para promoção da atividade antioxidante, portanto, uma importante atividade antioxidante.
- Os extratos da folha de *B. crassifolia* incorporados às bases emulsionadas, não alteraram a estabilidade das mesmas nos aspectos relacionados à separação de fases, viscosidade e aspectos organolépticos. A leve alteração do pH é compatível com o pH cutâneo.
- Os testes biológicos mostraram atividade antimicrobiana do extrato e das formulações farmacêuticas obtidas a partir das folhas de *B. crassifolia* frente a bactérias de importância clínica;
 - O extrato mesmo em concentrações mais altas não apresentou atividade hemolítica detectável e por isso, foi classificado como não irritante.
 - A toxicidade do extrato apresentou é considerada moderada frente *Artemia salina*.
 - O Extrato apresentou atividade citotóxica em células de fibroblasto de pulmão e não apresentou atividade citotóxica em carcinoma de próstata e adenocarcinoma de mama.
 - As formulações manipuladas são consideradas potencialmente viáveis no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de doenças infecciosas de origem bacteriana.

REFERÊNCIAS

- ABIDILLE, M.D.H.; SINGH, R.P.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JENA, B.S. **Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits**. Food Chem, Washington, v.90, p.891-896, 2005.
- ALDERMAN, D. J.; SMITH, P. **Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases**.Aquaculture, v. 196, p. 211-243, 2001.
- ALVAREZ, C. **Resistencia Antimicrobiana en Unidades de Cuidado Intensivo de Bogotá, Colombia, 2001–2003**. Revisa de Salud Pública, v. 8, n. 1, p. 86-101, 2006.
- ALVES et al. **Ascorbic acid and phenolic contents, antioxidant capacity and flavonoids composition of Brazilian Savannah nativefruits**. Food Sci. Technol, Campinas. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v37n4/0101-2061-cta1678-457X26716.pdf>. Acesso em: 07/11/2017.
- ALVES, T. M. de A.. **Biological screening of Brazilian medicinal plants**.Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, June 2000.
- ALVES, C. Q. **Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos**. Quím. Nova, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>> Acesso em: 10 jul. 2017.
- AMADO, N. G.; CERQUEIRA, D.M.; ³MENEZES, F.S.;SILVA, J.F.;MOURA NETO,V.;ABREU, J. G.; **O Flavonóide Isoquercetina Promove a Diminuição Da Proliferação De Glioblastoma Multiforme Humano**. Crescimento e morte celular.
- AMARQUAYE, A.; CHE, C. T.; BEJAR, E.; MALONE, M. H.; FONG, H. H. S. **A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia***.Planta Med., v. 60, n. 1, p. 85-86, 1994.
- ANDERSON, W. R. **Byrsonimoideae, a new sub-family of Malpighiaceae**.Biotropicav. 7, p. 5-18. 2018.
- ANDERSON, W. R. **The origin of the Malpighiaceae – The evidence from morphology**. Mem. N. J. Bot. Gard. v. 64, p. 210-224. 2018.
- ANDRESSA, A. B.C.; FRASSON, A. P. Z. . **Influência do armazenamento na estabilidade de condicionadores capilares**. Revista Contexto & saúde ijuí editora unijuí v. 10 n. 19 jul./dez. 2010 p. 51-58
- ANTUNES, R.M.P. **Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes**.Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, p. 517-524, 2006.
- ARAGÃO, B.P.; OLIVEIRA, A. K.S.; SOUSA, D.A.; ANDRADE, E.R.S. **Compostos Bioativos e Capacidade Antioxidante in Vitro de Sementes De Murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Rich)**, 3º Congresso de atividade física, nutrição e Saúde, 2017.

ARAÚJO, A. R. B. **Morfologia de frutos, sementes e plântulas, tipo e aspectos da germinação de algumas espécies de Malpighiaceae.** Campinas, 1994. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biologia da Universidade de Campinas, São Paulo.

ARAÚJO, C.A.C; LEON L.L. **Biological activities of Curcuma longa L.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 96, p.723-728, 2001.

ARAÚJO, L. L. N.; FARIA, M. J. M.; SAFADI, GIULIANA M. V. V. **Prospecção fitoquímica da espécie Justicia pectoralis JACQ. VAR. STENOPHYLLA LEONARD** pertencente à família ACANTHACEAE. Revista Eletrônica de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia – FaSeM Ciências. Uruaçu, v.6, n.2, 2014. Disponível em:Acesso em: 18 de março de 2016.

ARBOS, K. A.; STEVANI, P. C.; CASTANHA, R. F. **Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga.** Revista Ceres, v. 60, n.2, p. 161-165, 2013. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/rceres/v60n2/v60n2a03.pdf>>.

AVILA, M.A. **Quercetin mediates the down regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468.**Cancer Res., v.54, p. 2424-2428, 1994.

BABY A.R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO C.A.; SARRUF F.D.; TAVANTEJUNIOR C.R.; PINTO CASO, ZAGUE V., AREAS E.P.G.; KANEKO T.M.; VELASCO M.V.R.; **Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo.** Rev Bras Ciênc Farm. 2008; 44: 233-8.

BADKE, M.R.**Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular.**Escola Anna Nery. v.15, n.1, p.132-9, 2011.

BASTOS, I. dos S. **Avaliação da Atividade Antibacteriana, Antifúngica e Antimalárica de extratos, frações e composto obtidos de plantas da região amazônica.** Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) – Universidade Federal da Amazônia, 2016.

BEJAR, E.; AMARQUAYE, A.; CHE, C. T.; MALONE, M. H.; FONG, H. H. S.; Int. J. Pharmacogn. 1995,33,25.

BELISÁRIO, C. M; CONEGLIAN, R. C. C. **Qualidade de frutos de murici (Byrsonima crassifolia, Malpighiaceae) armazenados sob refrigeração.** Global Science and Technology, v. 06, n. 2, p. 95-101, 2013. Disponível em:.doi: 10.14688/1984-3801.v06n02a11.

BELLA CRUZ, A. B. et al. **Métodos “In Vitro” na Avaliação da Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos.**In: BRESOLIN, T. M. B. (Org.); CECHINEL-FILHO, V. (Org.). Fármacos e Medicamentos: uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Santos, 2010. cap. 7. p. 175-205.

BERGER, I.; BARRIENTOS, A. C.; CACERES, A., HERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L.; PASSREITER, C. M.; KUBELKA, W. **Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections: II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against Trypanosoma cruzi.** J. Ethnopharmacol., v. 62, p. 107–115, 1998.

BERRIDGE, M.V.; HERST, P.M.; TAN, A.S. **Tetrazolium dyes as tools in cell biology: 377new insights into their cellular reduction.** Biotechnology Annual Review, v. 11, p. 127–152.2005.

BIANCO L.; LIMA F.V; **Estudo de formulações dermatológicas contendo despigmentantes cutâneos para tratamento de Hiperchromias** [Internet]. Universidade do Sul de Santa Catarina; UNISUL; 2007.

BOUCHER H.W; TALBOT G.H; BRADLEY J.S; EDWARDS J.E; GILBERT D.; RICE L.B; **Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America.** Clin Infect Dis. 2009; 48(1): 1-12.

BRASIL. ANVISA. Farmacopéia Brasileira 5ª Edição, v2, Publicada no DOU N° 224, 24 de novembro de 2010.

BRASIL. ANVISA. **Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos.** Guia 04/2015.

BRASIL.ANVISA. **Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos.** RESOLUÇÃO - RDC N° 45, DE 9 DE AGOSTO DE 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 971, 3 de maio de 2006: Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde.** 2006. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt0971_03_05_2006.html>. Acesso em: 11 ago. 2016.

BRASIL. **Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos.** Portaria Interministerial N° 2.960, de 9 de dezembro de 2008. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRESOLIN, T. M. B. (Org.); CECHINEL-FILHO, V. (Org.). **Fármacos e Medicamentos: uma abordagem multidisciplinar.** São Paulo: Santos, 2010. cap. 7. p. 175-205.

BRUNETON, J.; **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia,** Ed. Acribia, SA: Espanha, 1991.

BUHLER F.; V, FERREIRA J.R.N.; **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações contendo extratos de Ilex paraguariensis St. Hil. a 5 e 10%.** Rev Perspect. 2008;32:47-55.

BUTLER, M. S.; **Natural products and drugs: natural product derived compounds in clinical trials.** Nature Reviews drug Discovery, v. 25, 415, 2008.

CACERES, A.; LÓPEZ, B.; JUÁREZ, X.; **Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections.** II Evaluation of antifungal activity of American plants. Journal of Ethnopharmacology, v. 40, p. 207-213, 1993.

CALIXTO, J. B. **Twenty-five ears of research on medicinal plants in Latin America – A personal view.** Journal of Ethnopharmacology, v.100, n. 131, 2005.

CANTON, E.; VIUDES, A.; PERMÁN, J. **Infecção sistêmica nosocomial por leveduras.** Revista Iberoamericana Micologia, v. 18, p. 51-55, 2001.

CANTRELL, C. L.; L.U, T., FRONCZEK, F. R.; FISCHER, N. H.; ADAMS, L. B.; FRANZBLAU, S.G.; **Antimycobacterial cycloartanes from *Borrchia frutescens*.** J. Nat. Prod., v.59, p.1131-1136, 1996.

CARDOSO, C.R.P. **Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsinima crassa* Niedenzu e *Byrsonimaintermédia* A.Juss.** 100f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) pela UNESP, Araraquara, São Paulo, 2006.

CARVALHO, C. Cipó-Cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers – Bignoniaceae): **Estudo Fitoquímico e Toxicológico envolvendo *Artemia Salina*.** Revista Eletrônica de Farmácia, vol. 6 (1), 51-58, 2009.

CASTRO, H. G.; CASALI, V. W. D.; BARBOSA, L. C. A.; CECON, P. R.; Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 1999, 1, 29.

CASTRO, I. A.; **2,2 -Diphenyl-1-picrylhydrazil free radical scavenging activity of antioxidant mixtures evaluated by response surface methodology.** International Journal of Food Science & Technology, v. 41, p. 59-67, 2006.

CAO, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. **Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships.** Free Radic Biol Med.; 22(5):749-60. 1997.

CDB. CONVENÇÃO DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA. **Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization to the Convention on Biological Diversity.** Secretariat of the Convention on Biological Diversity, United Nations. 2011. Disponível em: <<http://www.cbd.int/abs/doc/protocol/nagoya-protocol-en.pdf>>. Acesso em: 11 ago. 2016.

CHENG, Z.; MOORE, J.; Y.U, L. **High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay.** Journal of Agricultural and Food Chemistry v. 54, n. 20, p. 7429-7436, 2006.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. **EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs.** Food Chemistry, v. 138, n. 1, p. 414-420, 2013.

CHORILLI, M. **Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistema nanoestruturados contendo palmitato de retinol: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo.** 2007. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.

CLEELAND L, Squires E. **Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infections.** In: V.M.D. Lorian. Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore: Williams e Wilkins, 1991.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;** Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013. Cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. -- 1. ed. -- Brasília: ANVISA, 2004. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cosmeticos.pdf>> Acesso em: 11 jul. 2017.

CNI. CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA (Brasil). **Estudos sobre os impactos da adoção e implementação do Protocolo de Nagoia para a indústria brasileira.**2014. Disponível em:<http://arquivos.portaldaindustria.com.br/app/conteudo_24/2014/12/09/516/EstudossobreosImpactosdoProtocolodeNagoia.pdf>. Acesso em: 8 ago. 2016.

CORNER, E. J. H. **The seeds of dicotyledons.** Cambridge, University Press, 2v. 1976.

COS, P. **Anti-infective potencial of natural products: how to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”.**Journal of Ethnopharmacology, v. 106, n. 290, 2006.

COSTA, C. B. N.; **Biologia reprodutiva de espécies simpátricas de Malpighiaceae em dunas costeiras da Bahia,** Brasil. Revista Brasil. Bot., V.29, n.1, p.103-114, jan.-mar. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbb/v29n1/a10v29n1.pdf>>. Acesso em: fev. 2016.

COSTA JÚNIOR. **Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) on epilepsy models.** Epilepsy & Behavior, Vol. 22, p. 678-684, 2011. Disponível em: <<http://www-sciencedirect-com.ez14.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1525505011005543>> Acesso em: 17 jun. 2017.

CRAGG, G. M.; NEWMANN, D. J. **Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia.** Itajaí: UNIVALI, cap. 3, 2007.

CRONQUIST, A.; **An integrated system of classification of flowering plants.**New York: Columbia University Press, 1981.

DARONCHO, M. **Quantificação da Atividade Antioxidante Através de Análises Pelos Métodos DPPH e ABTS.** VI Seminário de Nutrição da UNIFRA. Julho 2012. Disponível em: <http://www.unifra.br/eventos/seminarionutricao2012/Trabalhos/4392.pdf>. Acesso em 23 Jul 2017.

DEGEN, A. N. et al. **Ensaio toxicológico de infusões das folhas de *Platonia insignis* frente ao microcrustáceo *Artemia salina***. XXIII Salão de Iniciação Científica: Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná - CEULJI/ULBRA, 2016.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H.; **An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii***. Nat Rev Microbiol. 2007;5(12):939-51. Disponível em: <http://link-periodicos-capes.gov.br/ez14.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=fi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_ver=Z39.88-2004&rft_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=111072116855000&svc.fulltext=yes> Acesso em: 15 abr. 2017.

DINIZ, A. C. B.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R.; **Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento**. Acta Botanica Brasílica, Belo Horizonte, p.443-450, 2007.

DAVID, J. M.; SANTOS, F. A.; GUEDES, M. L. DA S.; Quim. Nova 2003, 26, pag 484.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M.; **Produtos fitoterápicos: Uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos**. Infarma Ciências Farmacêuticas. v.16, nº 9-10, 2014. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/78/19-produtos.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2015.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. **A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay**. Food Chemistry v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011. ISSN 0308-8146.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. John Wiley & Sons LTD, 2º ed., p.291-300. 2002.

DI STASI, Luiz Claudio. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência: Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Unesp, 2016. 230 p.

DOLABELA, M.F. **Triagem in vitro para a Atividade Antitumoral e anti-T. cruzi de Extratos Vegetais, Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas**. 1997. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DUARTE, M. C. T.; **Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil**. Universidade Estadual de Campinas Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas. 2006. Disponível em:

<http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2017.

DUTRA, Maria da Glória. **Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás**. 2009. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente, Centro Universitário de Anápolis, Anápolis, 2009.

ESAU, K. Anatomia vegetal. Barcelona: Omega, 1985. 779 p. espécies vegetais úteis: 38-9, Planaltina: EMBRAPA, 1998. 465p.

- FALAGAS, M. E.; KARVELI, E. A.; KELESIDIS, I. et al. **Community acquired *Acinetobacter* infections**. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007; 26(12):857-68.
- FANK-DE-CARVALHO, S. M.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Arquitetura, **anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* L.f. (Amaranthaceae)**. Acta Bot. Bras. v.19, p. 377-390. 2005.
- FELÍCIO, J. D.; GONÇALEZ, E.; LINS, A. L.; BRAGGIO, M. M.; DAVID, J. M.; **Triterpenos isolados das folhas de três espécies de *Byrsonima***, Arq. Inst. Biol., v.62, n. 1,2, p.91-92, 1995.
- FENNER, R. **Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.
- FERREIRA, A. O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 4.ed., rev. e ampl. v.1. São Paulo: Pharmabooks Editora, 2010.
- FERRER, E.G.; SALINAS, M.V.; CORREA M.J.; NASO, L.; BARRIO DA, E.S.B. et AL. **Synthesis, characterization, antitumoral and osteogenic activities of quercetin vanadyl (IV) complexes**. J Biol Inorg Chem.;11(6): 791-801. 2006.
- FINNEY, D. J. Probit Analysis. Cambridge, Cambridge University Press, 1962.
- FLÁVIA R. O. A.; ALINE A. S.; ARANTES, M. C. B.; JOSÉ R. P.; MARIA T. F. B. **Análise Microbiológica de Matérias Primas e Formulações Farmacêuticas Magistrais**. Revista Eletrônica de Farmácia Vol 2(2), 38-44, 2005.
- FLOWERES F.L.;**Salmonella**.Food Technology 2014; 42(4):182-185.
- FOGLIO, Mary Ann et al. **Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar**. Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp, Campinas, v. 7, n. 5, p.1-8, out. 2006.
- FRANCO, M. M. B. **Etiologia e resistência bacteriana em unidades de terapia intensiva através de culturas de vigilância**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Natal, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/23573/1/MayaraMariaBastosFranco_DISSERT.pdf> Acesso em: 04 jul. 2017.
- FRESHNEY, R. I.**Culture of animal cells: a manual of basic technique**, 4a Edn. Indianapolis. Wiley- Liss, 2000.
- FRIEDRICH M.; PRIMO F.T.; FUNCK J.A.B.; LAPORTA L.V.; ALVES M.P.; BITTENCOURT C.F.; ESCARRONE A.L.V.; **Avaliação da estabilidade físico-química de creme não iônico inscrito no Formulário Nacional**. Lat Am J Pharm. 2007; 26(4): 558-62.
- FRIERI, M., KUMAR, K.& BOUTIN, A. 2016. **Antibiotic resistance**. Journal of Infection and Public Health, in press.

GALVEZ, M. et al. **Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines.** *Journal of ethnopharmacology*, v. 88, n. 2, p. 125-130, 2003.

GALVEZ, J.; CRESPO, M. E.; JIMENEZ, J.; SUAREZ, A.; ZARZUELO, A. **Antidiarrheic activity of quercitrin in mice and rats.** *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 45, n. 2, p. 157- 159, 1993.

GALVEZ, J.; DUARTE, J.; DEMEDINA, F. S.; JIMENEZ, J.; ZARZUELO, A. **Inhibitory effects of quercetin on guinea-pig ileum contractions.** *Phyto. Res.*, v. 10, n. 1, p. 66-69, 1996.

GALVEZ, J.; ZARZUELO, A.; CRESPO, M. E.; UTRILLA, M. P.; JIMENEZ, J.; SPIESSENS, C.; DEWITTE, P. **Antidiarrheic activity of *Sclerocaryabirrea* bark extract and its active tannin constituent in rats.** *Phyto. Res.*, v. 5, n. 6, p. 276-278, 1991

GEISS, F.; HEINRICH, M.; HUNKLER, D.; RIMPLER, H.; HEINRICH, M. **Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark.** *Phytochemistry*. v. 39, p. 635–643, 1995.

GELLEN, L. F. A.; SILVA, E. H. C. **Atividade antimicrobiana de extratos de raízes de *Byrsonima crassifolia*.** *Journal of Bioenergy and Food Science*, v. 3, n. 2, p. 63-71, 2016. Disponível em: doi: 10.18067/jbfs.v3i2.88.doi: 10.18067/jbfs.v3i2.88.

GIBBONS, S. **Plants as a source of Bacterial Resistent Modulators and anti-infective agents.** *Revista Phytochemistry*, v. 4, 63, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, P. N. **Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** *Química Nova*, v. 30, p. 374, 2007.

GOTTLIEB, O.R.; HENRIQUES MENDES, P.; TAVEIRA MAGALHÃES, M. **Triterpenoids from *Byrsonima verbascifolia*.** *Phytochemistry*. v.14, n.5-6, p.1456- 1456, 1975.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G.; **Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas.** *Estudos Avançados, São Paulo*, v. 24, n. 70, p.81-98, 2010.

GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA. **Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae),** *Química Nova. Manaus*, v. 34, n. 1, p. 1032-1041, 2011.

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F. A.; FONSECA JÚNIOR, E. M. **Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. Ex A. Juss).** *Cerne, Lavras*, v. 12, n. 1, p. 84-91, 2006.

HEINRICH, M. **Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures?** *Current Top Med Chem*, v. 3, p. 141–154. 2003.

HEINRICH, M.; RIMPLER, H.; BARRERA, N. 1992. **Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): ethnopharmacologic evaluation.** *Journal of Ethnopharmacology*, 36:63-80. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037887419290062V>. Acesso em 05>
Acesso em: fev. 2016.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. **Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands.** J. Agr. Food Chem., v. 40, p. 2379-2883, 1992.

HERTOG, M.G.L.; **Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands.** Nutr. Cancer, v.20, n.1, p.21- 29, 2013.

HUANG, D.; PRIOR, R. L. **The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays.**, Journal of Agricultural and Food Chemistry v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUNG, J.; HSU Y.; KO.Y.; TSAI Y.; YANG C.; HUANG, M.; KU P. **Didymin a dietary flavonoid glycoside from citrus fruits, induces Fas- mediated apoptotic pathway in human non-small-cell lung cancer cells in vitro and *in vivo*.**Lung Cancer. V.68, p. 366-374. 2010.

JAWETZ M.; ADELBERG E.*Microbiologia médica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

JAYAPRAKASHA, G. K.; GIRENNAVAR, B.; PATIL, B. S.; Bioresour. Technol. 2008, 99, 4484.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. **Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities.**Food Analytical Methods, v. 2, n. 1, p. 41-60, 2009. ISSN 1936-9751.

KARLING, M.;**Estudo do potencial antioxidante do bagaço de uva utilizando técnica de fracionamento líquido-líquido.**Syn. scy. UTFPR, Pato Branco, v. 12, n. 1, p. 88–93, 2017.

KILKUSKIE, R. E.; KASHIWADA, Y.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I.; BODNER, A.; CHENG, Y.; LEE, K.; Bioorg. Med. Chem. Lett. 1992, 2, 1529.

KNEKT, P. **Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and a other malignant neoplasms.** Am. J. Epidemiol., Baltimore, v. 146, p. 223-230, 1997.

KNEKT, P. **Flavonoid intake and risk of chronic diseases.** Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v. 76, p. 560- 568, 2002.

KOKIS, V. M. **Identification of an imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa clone among patients in a hospital in Rio de Janeiro.** J Hosp Infect, v. 60, n. 1, p. 19-26, 2005.

KRIVENKO, V.V.; POTEBNIA, G.P.; LOIKO, V.V. **Experience in treating digestive organ diseases with medicinal plants.** Vrach Delo, v. 3, p. 76-78, 1989.

KUHLMAN, M.K. **Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin.** Arch. Toxicol., Berlim, v. 72, p. 536-540, 1998.

- KUMAR, M.R.; AITHAL, K.; RAO, B.N.; UDUPA, N.; RAO, B.S. **Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells.** *Toxicol In Vitro.* v.23, n.2, p.242-250, 2009.
- KUNTZ, S.; WENZEL, U. DANIEL, H. **Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines.** *Eur. J. Nutr.*, v.38, p.133-142,1999.
- LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE).**São Carlos: RiMa, 2004.
- LANGLEY, P. **Why a pomegranate?***British of Medicine Journal*, v. 321, n.4, p. 1153-4, 2000.
- LEITE, João Paulo Viana. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas.** São Paulo: Atheneu, 2009. 328 p.
- LEONARDI, G. R. *Cosmetologia Aplicada.* 1.ed. São Paulo: Editora MEDFARMA, 2005.
- LEONARDI, G.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. **Estabilidades de formulações cosméticas.** *Int. J. Pharm. Compound.* 2001; 3(4): 154-156.
- LINCOPAN, N.; TRABULSI, L. R. **Pseudomonas aeruginosa.** In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia.* 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 369-81.
- LINS, A. C. S.; AGRA, M. F.; CONCEIÇÃO, D. C. O.; PINTO, F. C. T.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. **Constituintes Químicos e Atividade Antioxidante das Partes Aéreas de *Clusia paralicola* (Clusiaceae) e *Vismia guianensis* (Hypericaceae).***Rev. Virtual Quim.*, 2016, 8 (1), 157-168.
- LOPEZ, A., HUDSON, J.B., TOWERS, G.H.N., **Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants.** *Journal of Ethnopharmacology* v. 77, p. 189–196. 2001.
- LÓPEZ, C. A. **Considerações gerais sobre plantas medicinais.** *Ambiente: Gestão e Desenvolvimento, Roraima* v. 1, n. 1, p. 19-27, 2016.
- LOPES, D. C.D. X. P.; SANTOS, E. P.; TOMASSINI, T. C. B. **Atividade antisséptica de formulações contendo extrato etanólico de frutos de *Physalis angulata* L.***Rev. Bras. Farm.*, 86(2): 75-77, 2005. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Elisabete_Santos/publication/235993155_Antiseptic_cosmetic_formulations_using_Physalis_angulata_L._fruit's_ethanolic_extract/links/0c9605154dc67f03800000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Elisabete_Santos/publication/235993155_Antiseptic_cosmetic_formulations_using_Physalis_angulata_L._fruit's_ethanolic_extract/links/0c9605154dc67f0380000000.pdf)>. Acesso em: 23 jun. 2017
- LORENZO, E. **Sobre la inflorescência, morfologia floral y embriologia de *Janusia guaranítica* (Malpighiaceae).** *Kurtziana.* v. 14, p. 101-124. 1981.
- LOURENÇO, I. P.; **Potencial de utilização de frutos de genótipos de muricizeiros cultivados no litoral do Ceará.** Universidade do Ceará, Fortaleza, 2018
- LUNA, J.S.. **A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil.** *Journal of Ethnopharmacology.* 2005. p. 199 – 206.

- MACHADO, K. E. **Potent antibacterial activit of *Eugenia umbelliflora***. Pharm. Biol., 43, 636, 2009.
- MAK, J.K.; KIM, M.J.; PHAM, J. et al. **Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii***. J Antimicrob Chemother. 2009;63(1):47-54.
- MALLAVADHANI, U. V.; SUDHAKAR, A. V. S.; SATYANARAYANA, K. V. S.; MAHAPATRA, A.; LI, W.; VAN BREEMEN, R. B.; Food Chem. 2006, 95, 58.
- MARINHO, R. O. S. **Estudo Fitoquímico da Espécie *Byrsonimasericea* e sua aplicação em dermatocsmética - 2008**. xxi, 100 f.: il..MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. **Acinetobacter multirresistente—um desafio para a saúde pública**. Sci Med, v. 23, n. 1, p. 56-62, 2013.
- MARTINS, C.H.G.; SOUZA, F.R.; FONSECA, C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; AMBROSIO, S. R.; CUNHA, W.R. (2010). **Determinação in vitro da atividade antibacteriana dos extratos da casca e polpa farinácea de *Hymenaea courbaril* L**. Revista Investigação, 10(1): 37-43.
- MATOS, Francisco José de Abreu. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: UFC, 2009. 25 p.
- MCLAUGHLIN, J. L. **Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation**. Meth Plant Biochem, 1991; 6:1–32.
- MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. **Em Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, Capítulo 1, p.13-26, 2001.
- MELO, P.S. **Derivados da desidrocrotonina: síntese, atividade antiulcerogênica e citotoxicidade**. 2000.116 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- MELO, R. R. **Perfil fitoquímico, avaliação da atividade antimicrobiana e biocompatibilidade de *Syzygium malaccense* (L) Merr. & L. M. Perry (Myrtaceae)**. 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.
- MENDES, C. **Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC Program Brazil 2002**. Braz J Infect Dis, v. 9, n. 1, p. 44-51. 2005.
- MENDES, C.C.; CRUZ, F.G.; DAVID, J.M.; NASCIMENTO, I.P.; DAVID, J.P. **Triterpenes esterified with fatty acid and triterpene acids isolated from *Byrsonima microphylla***. Quim. Nova. v.22, n.2, p. 185-188, 1999.
- MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA, M. C.; REZENDE, A. R.; FILGUIERAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. **Flora vascular do Cerrado**. Cerrado ambiente e flora. Brasília: EMBRAPA, 1998.

MENSOR, L. L. **Screening of Brazilian Plant extracts for antioxidant Activity by the use of DPPH Free Radical method.** Phitotherapy Research. v. 15, p. 127-130, 2001.

MEYER, B.N. **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents.** Planta Medica, v.45, n.5, p.31-4, 1982.

MICHEL, C.; BLANC, G. **Minimal inhibitory concentration methodology in aquaculture: the temperature effect.** Aquaculture, v. 196, p. 311-318, 2001.

MIGLIATO, K. F.; CARVALHO, E.S; SACRAMENTO, L. V. S.; MELLO, J. C. P.; BABY, A.R.; VELASCO, M. V. R.; SALGADO, H. R. N. **Total polyphenols from *Syzygium cumini* (L.) Skeels fruit extract.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 45, n. 1, jan./mar., 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjps/v45n1/15.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2017.

MILAN A.L.K.; MILÃO D, SOUTO A.A.; CORTE TWF. **Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia.** Rev Bras Cienc Farm. 2007; 43(4):650-7.

MIMS C,; PLAYFAIR J,; ROITT I. **Microbiologia médica.** Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. **Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: a critical review and results.,** Food Chemistry v. 130, n. 4, p. 1036-1043, 2012.

MONTEIRO, D. C. B.; SOUSA, W. C.; PIRES, C. R. F.; AZEVEDO, L. A.; BORGES, J. S. **Caracterização físico-química do fruto e da geleia de Murici (*Byrsonima Crassifolia*).** Enciclopédia Biosfera, Goiânia, v. 11, n. 21, p. 3356, 2015.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U, P, & ARAÚJO, E. L. **Taninos: uma abordagem da química à ecologia.** Química Nova, v.28, n.5, p.892-896. 2005.

MONTELLI, A.C.; SADATSUNE, T. **Antibioticoterapia para o clínico.** Sociedade Brasileira de Microbiologia. Rio de Janeiro, 2001.

MORAIS, S. M. de; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A.; **Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil;** Rev. Bras. Farmacogn.; 9; 315-320; 2009.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A.; Phytochemistry 2000, 55, 627.

MOSSMAN T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay.** J Immunol Methods. 1983;65:55-63. [cited 2016 July 17];65(1-2):55-63.

MURRAY, D.A.; CRISPE, I.N. **TNF- α controls intrahepatic T cell apoptosis and peripheral T cell numbers.** The Journal of Immunology, v. 173, n. 4, p. 2402-2409, 2004.

- MUSSER, J.; SHELBURNE, S. A. **A decade of molecular pathgenomic analysis of group A Streptococcus.** *Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 9 p. 2455-2463, sep. 2009.
- NASCIMENTO, J. C. **Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L.** *Rev. Bras. Farm.* 92(4): 327-332, 2011.
- NAVES, V. M. L. **Brasiliensis e avaliação do seu perfil de permeação cutânea em formulações dermatológicas.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.
- NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. **“Natural products as sources of new drugs over the 30 new years from 1981 to 2010”.** *J. Nat. Prod.*, 75: 311, 2012.
- NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C.M.S.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; FILHO, V.C. **Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos.** IN: Ciências Farmaceuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. BRESOLIN, T. M. B & FILHO, V. C. Editora Univali, Itajaí, 2003. p. 11 – 56.
- NIJVELDT, R.J. **Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications.** *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 74, p. 418-425, 2001.
- OECD **Test. 487:** in vitro mammalian cell micronucleus test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section, v. 4, 2010.
- OLOYEDE, K. G.; OKE, M. J.; RAJI, Y.; OLUGBADE, T. **Antioxidant and anticonvulsant alkaloids in *Crinum ornatum* bulb extract.** *World J Chem.* 2010;5: 26–31. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/280650872_Antioxidant_and_Anticonvulsant_alkaloids_in_Crinum_ornatum_Bulb_Extract>. Acesso em: 08 jul. 2017.
- OLSEN, S.J. **Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1993-1997.** *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 49, 2000. p. 1-51.
- O’NEILL, J. **Tackling Drug-Resistant Infections Globally: final report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance.** United Kingdom, 2016. Disponível em: <https://amrreview.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2017.
- ONU, United Nations, **Department of Economic and Social Affairs, Population Division** (2015). *World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables.* Working Paper No. ESA/P/WP.241. Disponível em: <https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/key_findings_wpp_2015.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2017.
- OSTROSKY, E. A. **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais.** *Revista Brasileira de Farmacognosia.* V. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OZAN, F. **Effect of mouthrinse containing propolis on oral microorganisms and human gingival Fibroblasts.** Eur J Dent 2007; 1(4):195-201. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2609911/>> Acesso em: 01 jul. 2017.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. **Método para Avaliação e Pesquisa da Atividade Antimicrobiana de Produtos de Origem Natural.** Revista Brasileira de Farmacognosia. Curitiba, v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PARAAKH, M. P.; RAVICHANDRA, V. D. **Natural Compounds as Anti Microbial Agents with In Silico Technique: A Review.** International Journal of Pharma Research and Health Sciences.; 4 (4): 1252-1260, 2016. Disponível em: <<http://www.pharmahealthsciences.net/pdfs/volume4-issue42016/1.vol4-issue4-2016-MS15299-review1.pdf>>. Acesso em: 01 jul. 2017.

PAYNE, D. J. **Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery.** Nature reviews. Drug discovery, v. 6, n. 1, p. 29, 2007.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. **Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen.** Clin Microbiol Rev. 2008;21(3):538-82. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2493088/>> Acesso em: 05 jul. 2017.

PHILLIPS, I. **A guide to sensitivity testing.** The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. N.27, p.1-50, 1991.

PIDDOCK, L.J.V. **Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria.** The Journal of Applied Bacteriology, 68, p.307-318, 1990.

PIMENTEL, V. P. **Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança?** Revista do BNDES, Rio de Janeiro, v. 1, n. 43, p.1-49, 2015.

PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C.; MASRTINS, E. R. **Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi.** Ciência Rural, v. 42, n.2, p. 326-331, 2012. Disponível em:.doi: 10.1590/S0103-84782012005000003.

PINTO, M. A. S.; **Técnicas de separação e identificação aplicadas a produtos naturais.** 2005. 52 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

PINTO T.J.A.; KANEKO T.M.; OHARA M.T.; 2003. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos.** 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora; 2003. P. 325 p.

PRESTES O.S.; RIGON R.B.; CORRÊA N.M.N.; LEONARDI G.R.I.; **Avaliação da estabilidade físico-química de emulsão acrescida de uréia dispersada, ou não, em Propilenoglicol.** Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2009;30(1):38-44.

RAMOS, D. D. **Atividade antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica.** Ciência Rural, Santa Maria, v.41, n.8, p.1331-1336, ago, 2011.

RAO, V. S. N.; SANTOS, F. A.; SOBREIRA, T. T.; SOUZA, M. F.; MELO, C. L.; SILVEIRA, E. R. **Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa***. *Planta Méd.*, v. 63, n. 2, p. 146-149, 1997.

RASTRELLI, L.; DETOMMASI, N.; BERGER, I.; CACERES, A.; SARAVIA, A.; DE SIMONE, F.; **Glicolipids from *Byrsonima crassifolia***. *Phytochemistry.*, v. 45, n. 4, p. 647-650, 1997.

RENWICK, M. J., BROGAN, D. M., & MOSSIALOS, E.A **systematic review and critical assessment of incentive strategies for discovery and development of novel antibiotics**. *The Journal of Antibiotics*, 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1038/ja.2015.98>>. Acesso em: 01 jul. 2017.

RIBOLDI G.P., FRAZZON J., AZEVEDO P.A.; FRAZZON A.P.G. 2009. **Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil**. *Braz. J. Microbiol.* 40:125-128.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. **Medicinal plants and antimicrobial activity**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, n. 80, 2005.

ROCHA, C. Q. et al. **Dimeric flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and assessment of their anti-*Trypanosoma cruzi* activity**. *Journal of natural products*, v. 77, n. 6, p. 1345-1350, 2014.

ROCHA, F. A. G. **O uso terapêutico da flora na história mundial**. *Holos*, Rio Grande do Norte. v. 1, n. 0, p. 49, 2015.

RUFINO, M. S. M. et al. **Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil**. *Food Chemistry*, London, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

RUFINO, M.S. M. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. SSN 1679-6535 Julho, 2007. Fortaleza, CE. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426953/1/Cot127.pdf>. Acesso em 23 Jul 2017.

RUIZ, A.L.T.G. **Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae)**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.15, n. 2, p.98-102, 2005.

RYSZ, J. **Serum Antioxidant Capacity is Preserved in Peritoneal Dialysis Contrary to Its Robust Depletion After Hemodialysis and Hemodiafiltration Sessions**. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, v. 14, n. 2, p. 209-217, 2010.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. **A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V.B.; DA SILVA, M.A.; ROCHA, L.R.M.; DOS SANTOS, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO, S.A.R.M.; VILEGAS, W. **Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts**. *J. Ethnopharmacol.*, v. 97, p. 1-6, 2005.

SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C.M.; COELHO, R.G.; SANTOS, L.C.; HIRUMALIMA, C.A.; BRITO, S.A.R.M.; VILEGAS, W. **Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK)**. *J. Chromatogr.*, v. 1035; p. 47-51, 2004.

SANO, S. M., ALMEIDA, S. P., (Eds.). **Cerrado ambiente e flora**. Brasília: EMBRAPA, 1998.

SANTOS, J. J., **Fitoterapia: Dos senhores e das ervas medicinais**. 2006. Disponível em: <<http://www.joacir.com.br/fitoterapia-dos-senhores-as-ervas-medicinais/>>. Acesso em: 13 ago. 2016.

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

SCHERER, R.; GODOY, H. T. **Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method.**, *Food Chemistry* v. 112, n. 3, p. 654-658, 2009.

SCHMITZ, W.; SAITO, Y. A.; ESTEVÃO, D.; SARIDAKIS, O. H. **Gren tea as a chemoprotector: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 127-133, jul./dez. 2005.

SHAHIDI, F.; H. O, C. **Phenolic Compounds in Foods and Natural Health Products**. *Acs Symposium Series*, [s.l.], p.315-320, 21 jul. 2005.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Boca Raton: Crc Press, 2003. 531 p.

SHEN, F.; WEBER, G. **Synergistic action of quercetin and genistein in human ovarian carcinoma cells**. *Oncol. Res.*, v. 9, p. 597-602, 2017.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis: UFRGS, 2000. 821 p.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: UFRGS, 2004. 1104 p.

SILVA, J. G. **Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus***. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v. 17, n. 4, p.1-6, 2007.

SILVA, J. K. R. **Estudo químico e das propriedades biológica dos óleos essenciais e extratos de espécies de *Piper* da Amazônia Oriental**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Química, 2010.

SILVA, L. A. G., **Controle de qualidade microbiológico de formulação magistral contendo fitoterápico.** Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos, Goiás, v. 7, n. 2, p.1-8, 2014.

SILVA, Luciano da Rocha et al. **Levantamento Etnobotânico das Plantas Mediciniais utilizadas pela população de Iporá.** III Seminário de Iniciação Científica - UEG, Iporá, 2006.

SILVA, S.R.; SILVA, A.P.; MUNHOZ, C.B.; SILVA JR.; M.C.; MEDEIROS, M.B.; (Eds.). **Guia de Plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros.** WWF, Brasília. 2001.
SINGH, B. Development and structure of Angiosperm seed - I. Bull. Nat. Bot.Gard., v. 89, p.1-115, 1964.

SOMERA, B. F. **Avaliação da atividade antisséptica de sabonete líquido contendo extrato glicólico de flores de *Tagetes patula* L.** Revista Saúde e Pesquisa, v. 8, n. 3, p. 461-467, set/dez. 2015. Disponível em <<http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/3991/2694>>. Acesso em: 26/ jun./ 2017.

SONODA, M. et al. **Cytotoxic activities of flavonoids from two *Scutellaria* plants in Chinese medicine.** Journal of ethnopharmacology, v. 91, n. 1, p. 65-68, 2004.

SOOBRAATTE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T.; Mutat. Res. 2005, 579, 200.

SU, J.F. **Protection againts hepatic ischemiareperfusion injury in rats by oral pretreatment with quercetin.** Biomed. Environ. Sci., v. 16, p. 1-8, 2003.

SURESH, T.; HATHA A. A. M.; SCREENIVASA, D. **Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* enteritidis and other salmonellas in the eggs and egg-storing trays from retails markets of Coimbatore, south India.** *Food Microbiology* 2006; 23(3):294-299.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology.** 4. ed. Surderkand Massachusetts: Sinauer, 2006, p.559.

TAKEUCHI, F. **Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species.** Journal of bacteriology, v. 187, n. 21, p. 7292-7308, 2005.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TENOVER, F. C. **Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria.** The American Journal of Medicine, v. 119, n. 6, p. 3-10, 2006.

TIBA, M. B.; NOGUEIRA, G. P.; LEITE, D. S. **Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli***

isoladas de pacientes com cistite. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 42, n. 1, p. 58-62, 2009.

TIWARI, V.K.; MISHRA, B.B. **Natural products:** An evolving role in future drug discovery. Eur. J. Med. Chem., 46: 4769, 2011.

TORRES, C. R. G.; KUBO, C. H.; ANIDO, A. A.; RODRIGUES, J. R. **Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na odontologia.** Pós-Graduação em Revista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, v. 3, n. 2, p.43- 52, 2000. Disponível em: doi: 10.14295/bds.2000.v3i2.87.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 720 p.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

UETA, B.; DURÃES, C.; ILÁRIO, C.; ASDORIAN, G.; KORROYVA, P.; UEDA, S.; MASUNARI, A. **Atividade antioxidante da catequina e análise comparativa com as vitaminas A e C.** III Simpósio de Ciências Farmacêuticas.

VACCARI, N. F. S.; SOCCOL, M. C. H.; Ide, Gilberto Massashi. **Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças.** Revista de Ciências Agroveterinárias, Lages, v.8, n.1, p. 71-83, 2009. Disponível em: Acesso em: 11 set. 2014.

VEIGA-JUNIOR, V. F. **Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro:** aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. Ver BrasFarmacogn 18: 308-313, 2008.

VIEIRA, R. F.; RICHINS, R. C. **Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas:** resultados da primeira reunião técnica. Brasília: EMBRAPA - Recursos genéticos e biotecnológico. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq), 2002, p. 54.

VIEIRA, V. V. **Metalo-B-lactamase produced by carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa in Brazil.** Clin Microbiol Infect, v. 11, n. 11, p. 937, 2005.

VIGNAROLI C., ZANDRI G., AQUILANTI L., PASQUAROLI S.; BIAVASCO F. 2011. **Multidrug-resistant Enterococci in meat and faeces and co-transfer of resistance from an Enterococcus durans to a human Enterococcus faecium.** Curr. Microbiol. 62:1438-1447.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, GISELE. E.B.; **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância.** 2010. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/886074/1/documento316.pdf>> . Acesso em: 14 ago. 2016.

WALKER, T. D. **The Medicines Trade in the Portuguese Atlantic World:** Acquisition and Dissemination of Healing Knowledge from Brazil (c. 1580-1800). Social History Of Medicine, Oxford, v. 26, n. 3, p.403-431, 16 maio 2013.

WHO, World Health Organization. **The World Medicines Situation Report** [Internet]. WHO. 2011 [cited 2014 Jul 24]. Available from: http://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/wms_intro/en/index.html

WHO, World Health Organization. **Traditional Medicine Strategy: 2014-2023**. Geneva: World Health Organization; 2013. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090_eng.pdf?ua=1> Acesso em: 20 jun. 2017.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, C. **The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Production - A Review**. J. Agric. Food Chem., Vol. 53, No. 21, 2005. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/7546783_The_Impact_of_Saponins_or_Saponin-Containing_Plant_Materials_on_Ruminant_ProductionA_Review>. Acesso em: 08 jul. 2017.

WOLFGANG, J. W. P.; PFANNENBECKER, U.; HOPPE, U. **Validation of Red Blood Cell Test System as in Vitro Assay for the Rapid Screening of Irritation Potential of Surfactants**. Molecular Toxicology, v. 1, p. 525-536, 1987.

XAVIER, C. A. C. **Prevalência de *Staphylococcus aureus* em manipuladores de alimentos das creches municipais da cidade do Natal/RN**. Revista Brasileira de Análises Clínicas, v. 39, n. 3, 2007. p. 165-168.

XIAO, D.; ZHU, S.P.; GU, Z.L. **Quercetin induced apoptosis in human leukemia HL-60 cell**. Acta. Pharmacol. Sin., v. 18, p. 280-283, 1998.

ZOU L.K., WANG H.N., ZENG B., LI J.N., LI X.T., ZHANG A.Y., ZHOU Y.S., YANG X., XU C.W.; XIA Q.Q. 2011. **Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China**. New Microbiol. 34:73-80.

ANEXOS

ANEXO A - REQUERIMENTO DE PATENTE CONCEDIDA PELO INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL – INPI.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 009683 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Universidade Federal do Maranhão

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 06279103000119

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. dos Portugueses, 1966 - Cidade Universitária Dom Delgado, Vila Bacanga.

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65080-805

País: Brasil

Telefone: (98) 32728710

Fax:

Email: nit-dapi@ufma.br

Dados do Pedido

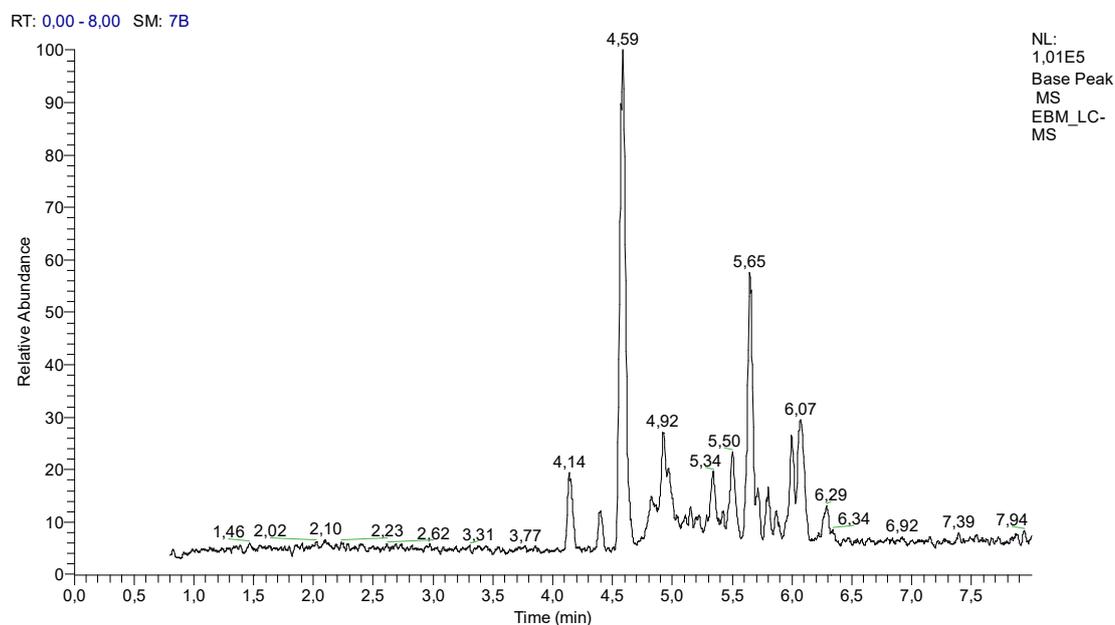
Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FITOTERÁPICO ANTIMICROBIANO OBTIDO A PARTIR DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Byrsonima crassifolia* (L) Rich. (Murici)

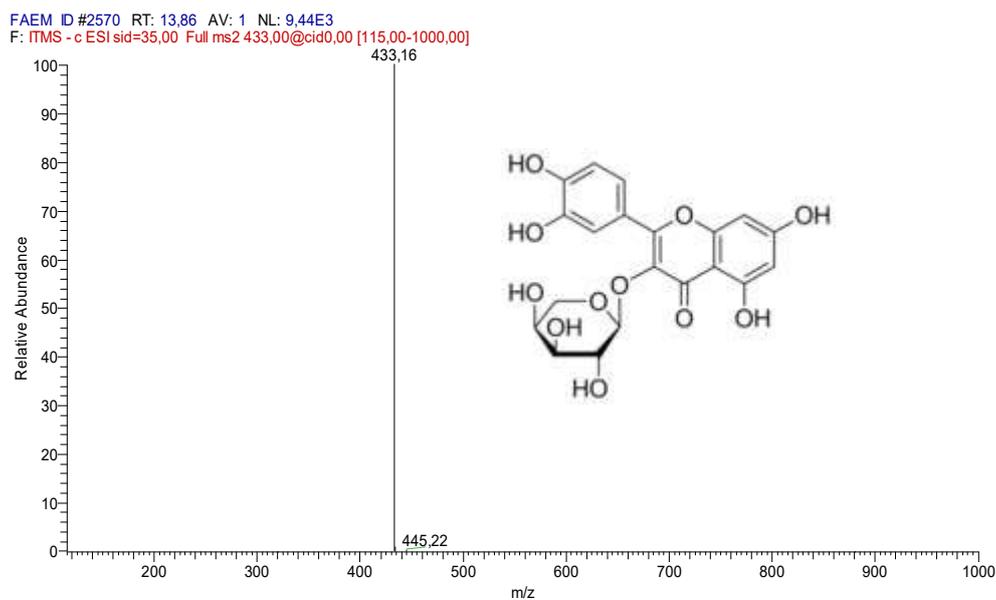
Resumo: A referida invenção compreende a obtenção de um fitoterápico antimicrobiano a partir das folhas de *Byrsonima crassifolia* (L) Rich, nas diferentes apresentações, tais como cápsula, solução, xarope, comprimidos, gel, creme, pasta, pomada, supositório, sabonete; com ação microbicida contra diversas bactérias e fungos de interesse clínico para tratamento isolado ou associado de infecções fúngicas e bacterianas para uso humano.

ANEXO B - ALGUNS DOS COMPONENTES MAJORITÁRIOS IDENTIFICADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS:

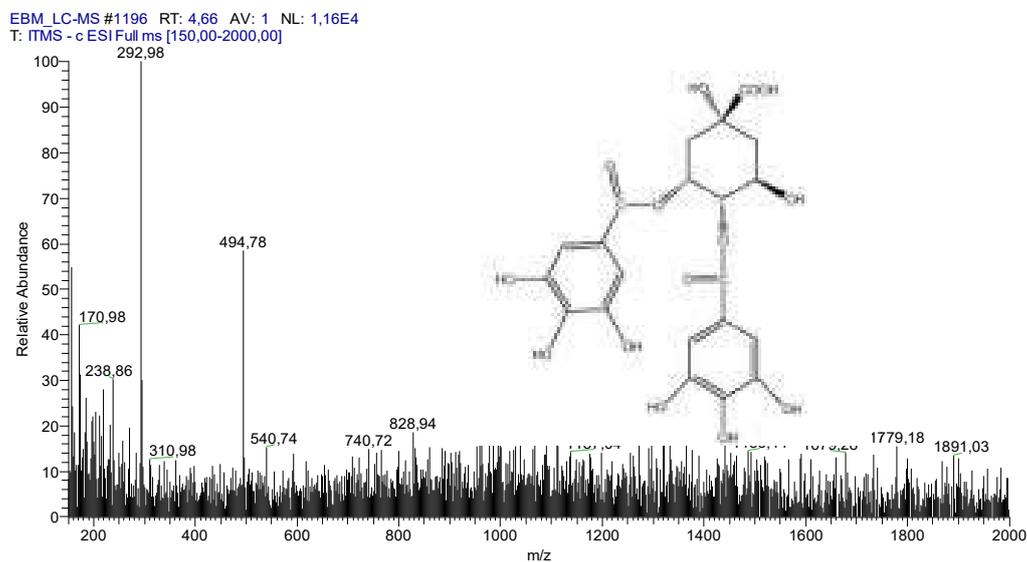
Screening fitoquímico por LC-ESI-IT-MS



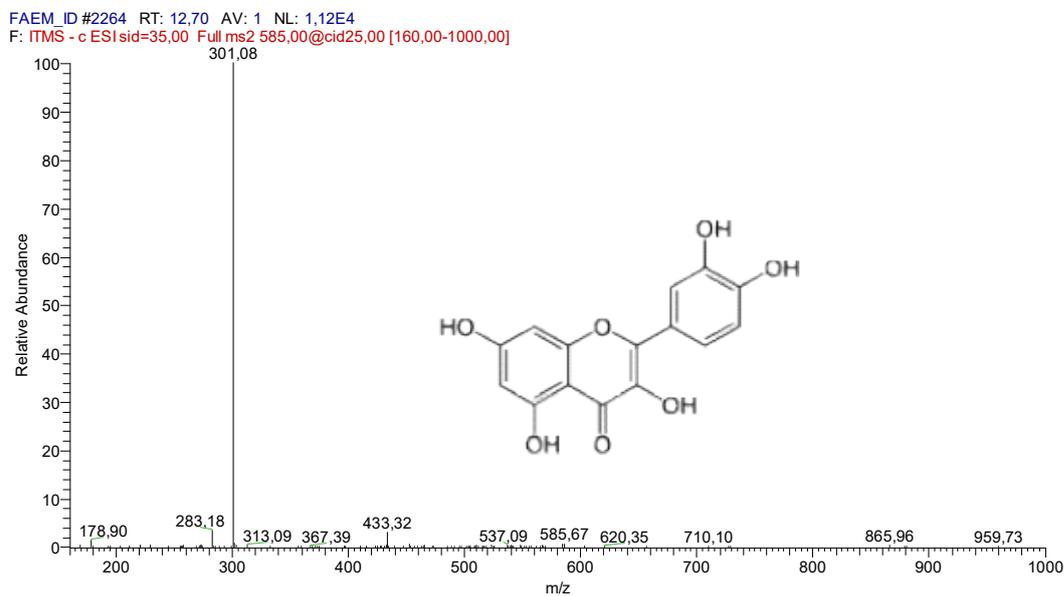
Constituinte químico Quercetina-3-Arabinosídeo identificado na fração acetato de etila das folhas de *B. crassifolia*.



Constituinte químico Ácido 3,4-di-O-galoil quinico identificado no EE das folhas de *B. crassifolia*.



Constituinte químico Quercetina identificado na fração acetato de etila de *B. crassifolia*.



Constituinte químico Isoquercetina identificado na fração acetato de etila de *B. crassifolia*.

FAEM_ID #2158 RT: 12,24 AV: 1 NL: 3,55E2

F: ITMS - c ESI sid=35,00 Full ms3 615,00@cid30,00 463,00@cid0,00 [125,00-1000,00]

