



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ELIZABETH FERNANDA DE OLIVEIRA BORBA

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO *MICONIA* (MELASTOMATACEAE)

Recife

2017

ELIZABETH FERNANDA DE OLIVEIRA BORBA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE TRÊS
ESPÉCIES DO GÊNERO *MICONIA* (MELASTOMATACEAE)**

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

Área de concentração: Química para a Saúde.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Teresinha Gonçalves da Silva

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª. Norma Buarque de Gusmão

Recife

2017

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Borba, Elizabeth Fernanda de Oliveira

Estudo químico e avaliação das atividades biológicas de três espécies do gênero *Miconia* (Melastomataceae) / Elizabeth Fernanda de Oliveira Borba - 2017.

81 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Coorientadora: Norma Buarque de Gusmão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas. Recife, 2017.

Inclui referências.

1. Antioxidante 2. Antimicrobiano 3. Câncer

I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orient.) II Gusmão, Norma Buarque
de (coorient.) III. Título

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-301

ELIZABETH FERNANDA DE OLIVEIRA BORBA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE TRÊS
ESPÉCIES DO GÊNERO *MICONIA* (MELASTOMATACEAE)**

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

Aprovada em: 20/02/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão (Membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Márcia Silva do Nascimento (Membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Jaciana dos Santos Aguiar (Suplente)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico essa conquista aos meus pais, por todo amor, carinho e dedicação. Mainha, obrigada pelo incentivo e por acreditar que eu sou capaz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, toda honra, toda glória e todo o louvor!

Aos meus pais, Ana Borba e Edvaldo Borba que com todo amor, carinho e dedicação me instruíram no caminho certo. Família, obrigada por fazer parte de mim.

Ao meu esposo, Fábio Martins pela paciência e por me fazer muito feliz. Obrigada pelo seu amor.

Aqueles que hoje, *in memorian*, nunca deixaram de acreditar em mim. Os meus Avós (Amaro Costa e Helena Borba) e a minha querida Noemia Soares. Sei que vocês estariam muito orgulhosos por mais esta conquista.

A Prof^ª. Dr^ª. Teresinha Gonçalves da Silva, pela oportunidade e seus valiosos ensinamentos que com seu exemplo de competência e dedicação à pesquisa contribuíram para a minha formação acadêmica e profissional.

A Prof^ª. Dr^ª. Norma Buarque de Gusmão que me acolheu com todo amor e me ensinou os primeiros passos da vida acadêmica ainda no Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos- LFEA.

A Prof^ª. Dr^ª. Márcia Silva do Nascimento pelas orientações e ensinamentos no universo da química e pelos momentos de descontrações no Laboratório de Química de Produtos Naturais/ Departamento de Antibióticos, UFPE.

Pela família do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial –LAMAI, que sem citar nomes, transformaram a minha vida acadêmica mais divertida e prazerosa. Ao amigo Pérsio, pelos aperreios no anexo do LAMAI, o Laboratório de Química.

A todos que fazem parte do Laboratório de Prospecção Farmacotóxica de Produtos Bioativos- BIOFARMATOX, e do Laboratório de Cultura de Células pela colaboração, em especial, a Prof^ª. Dr^ª. Jaciana Aguiar pelos ensinamentos, apoio e amizade.

Aos amigos e Mestres Tonny Cley e Larissa Cardoso que me acompanharam desde a graduação. Obrigada pela paciência, por todos os ensinamentos durante a pesquisa e pelos momentos de descontrações.

A Laís Nerys e Bruno Iraquitã que estão comigo desde as Iniciações Científicas, transformando os momentos do laboratório nos mais inusitados e aos companheiros Jéssica e Jhonatta, obrigada pelo apoio e amizade.

A Prof^ª. Dr^ª. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim pelo espaço cedido no Laboratório de Produtos Naturais- LAPRONAT, em especial ao colega Allan Chernichiarro pela ajuda.

Aos doadores voluntários que contribuíram em partes experimentais deste trabalho.

A Adenilda Eugênia de Lima, secretária da Pós-graduação em Ciências Biológicas pelo apoio e dedicação.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

“Todo o universo se formou no Seu falar... Dono de toda ciência, sabedoria e poder, do crente ao ateu, e se dúvida ou se acredita, ninguém explica DEUS...” (PINHO, C. 2016).

RESUMO

Espécies do gênero *Miconia* são descritas na literatura por possuírem propriedades antimicrobiana, antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória. Estas atividades estão associadas à presença de esteroides, terpenoides e flavonoides em diversos tipos de extratos. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química e as atividades biológicas dos extratos hexano (hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de *Miconia affinis*, *Miconia caiuia* e *Miconia pyrifolia* e isolar os possíveis compostos responsáveis por estas atividades. Os extratos foram submetidos à Cromatografia em Camada Delgada para determinação do perfil fitoquímico. Em seguida, foi realizado o doseamento de fenóis totais e residuais. O potencial antioxidante dos extratos foi avaliado pelos métodos de DPPH, ABTs e Fosfomolibdênio. Além disso, a citotoxicidade dos extratos, pelo método do MTT, foi analisada frente às células cancerígenas humanas e atividade hemolítica em eritrócitos de humanos. A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pelo teste de difusão em ágar com disco de papel e por microdiluição em caldo para determinar a Concentração Mínima Inibitória e a Concentração Mínima Microbicida. Foram utilizados micro- organismos Gram-positivos, Gram-negativos, Álcool-Ácido-Resistente e leveduriforme. Os extratos de *M. caiuia* também foram submetidos ao ensaio microbiológico com isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*- ORSA. No estudo químico, o extrato hexânico de *M. caiuia* foi fracionado em coluna líquida recheada com sílica e eluída com diferentes solventes orgânicos. As frações foram analisadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas e por Ressonância Magnética Nuclear. Os extratos AcOEt e MeOH de *M. caiuia*, foram analisados por Cromatografia Líquida acoplada a espectro de massas. A análise do perfil fitoquímico dos extratos de *Miconia* demonstrou a presença majoritária de triterpenos, esteroides e flavonoides. Os extratos apresentaram teores variados de fenóis totais e residuais. Em todas as metodologias empregadas foi possível verificar a alta capacidade do extrato MeOH em sequestrar os radicais livres. Os extratos apresentaram percentual de inibição de 100% frente as linhagens de leucemia MOLT-4, K-562 e HL-60 e não foram citotóxicos para as células normais. Todos os extratos de *Miconia affinis*, *Miconia caiuia* e *Miconia pyrifolia* apresentaram atividade antimicrobiana, porém o extrato hexânico de *M. caiuia* foi o mais ativo, inibindo o crescimento de *aureus* oxacilina resistente na concentração de 0,05 mg/mL. Estes resultados mostraram que as espécies de *Miconia* estudadas são fortes candidatas para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos com ação antimicrobiana e antineoplásica. Palavras-chave: Antioxidante. Antimicrobiano. Câncer.

ABSTRACT

Species of the genus *Miconia* are described in the literature because their antimicrobial, antioxidant, antitumor and anti-inflammatory properties. These activities are associated with the presence of steroids, terpenoids and flavonoids in various types of extracts. The aim of this work was to evaluate the chemical composition and biological activities of hexane (hex), ethyl acetate (AcOEt) and methanol (MeOH) extracts from *Miconia affinis*, *Miconia caiuia* and *Miconia pyrifolia* and to isolate the possible compounds responsible for these activities. The extracts were submitted to Thin Layer Chromatography to determine the phytochemical profile. Then, the total and residual phenols were assayed. The antioxidant potential of the extracts was evaluated by the methods of DPPH, ABTs and Phosphomolybdenum. In addition, the cytotoxicity of extracts by the MTT method and hemolytic activity in human erythrocytes. The antimicrobial activity of the extracts was evaluated by the diffusion test in paper disc agar and by microdilution in broth to determine Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Microbicidal Concentration. Gram-positive, Gram-negative, Alcohol-Acid- Resistant and yeast-like microorganisms were used. The extracts from *M. caiuia* were also submitted to a microbiological assay with clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. In the chemical study, the hexane extract of *M. caiuia* was fractionated in liquid column with silica and eluted with different organic solvents. The fractions were analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry and by Nuclear Magnetic Resonance. The extracts AcOEt and MeOH of *M. caiuia* were analyzed by Liquid Chromatography coupled to mass spectrum. The analysis of the phytochemical profile of the extracts of *Miconia* demonstrated the major presence of triterpenes, steroids and flavonoids. The extracts presented varied contents of total and residual phenols. In all the methodologies used it was possible to verify the high capacity of the MeOH extract in sequestering the free radicals. The extracts presented 100% inhibition percentage against MOLT-4, K-562 and HL-60 leukemia lines and were not cytotoxic for normal cells. All extracts of *Miconia affinis*, *Miconia caiuia* and *Miconia pyrifolia* presented antimicrobial activity, but the hexanic extract of *M. caiuia* was the most active, inhibiting the growth of *S. aureus* oxacillin resistant at a concentration of 0.05 mg/mL. These results showed that *Miconia* species studied are strong candidates for the discovery and development of new drugs with antimicrobial and antineoplastic action.

Keywords: Antioxidant. Antimicrobial. Cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição das espécies de <i>Miconia</i> nos biomas brasileiros.....	22
Figura 2- <i>Miconia affinis</i> no período de inflorescência (A) e infrutescência (B e C).....	23
Figura 3- <i>Miconia caiuia</i> no período de inflorescência (A e B) e infrutescência (C).....	24
Figura 4- Partes áreas de <i>M. pyrifolia</i> Naudin (A) e (B).....	24
Figura 5- Características adquiridas no câncer.....	26
Figura 6- Processo de desenvolvimento de uma célula cancerígena.....	27
Figura 7- Estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas.....	31
Figura 8- Alteração na estrutura das porinas.....	32
Figura 9- Alteração dos sítios-alvo após ligação do antibiótico.....	33
Figura 10- Representação do mecanismo de ação por bomba de efluxo.....	34
Figura 11- Cromatograma GC-MS da Fração 20.....	64
Figura 12- Esquema geral da fragmentação do β - mirina.....	65
Figura 13- Cromatograma GC-MS da Fração 21.....	66
Figura 14- Esquema geral da fragmentação do β - sitosterol.....	68
Figura 15- Cromatograma GC-MS da Fração 24.....	69
Figura 16- Cromatograma GC-MS da Fração 3.....	70
Figura 17- Cromatograma GC-MS da Fração 71	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Rendimento dos extratos brutos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) das espécies de <i>Miconia</i> estudadas.....	43
Tabela 2- Caracterização fitoquímica dos extratos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de <i>Miconia affinis</i> , <i>Miconia caiuia</i> e <i>Miconia pyrifolia</i> por cromatografia em camada delgada (CCD)	45
Tabela 3- Doseamento de fenois totais e taninos totais dos extratos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de <i>Miconia affinis</i> , <i>Miconia caiuia</i> e <i>Miconia pyrifolia</i> pelo método Folin- Ciocalteu.....	46
Tabela 4- Atividade antioxidante dos extratos.....	47
Tabela 5- Percentual de inibição do crescimento celular (IC %) dos extratos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de <i>Miconia affinis</i> , <i>Miconia caiuia</i> e <i>Miconia pyrifolia</i> em linhagens de células tumorais na concentração de 50 mg/ mL através do método colorimétrico MTT após 72 horas de tratamento.....	50
Tabela 6- CI ₅₀ dos extratos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de <i>Miconia affinis</i> , <i>Miconia caiuia</i> e <i>Miconia pyrifolia</i> e doxorrubicina (controle positivo) em células neoplásicas, através do ensaio colorimétrico MTT, após 72 horas de tratamento.....	52
Tabela 7- Média do perfil de sensibilidade antimicrobiana dos extratos em hexano (HEX), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) em milímetros (mm) de <i>Miconia affinis</i> , <i>Miconia caiuia</i> e <i>Miconia pyrifolia</i> na concentração de 30 mg/ mL.....	55
Tabela 8- Atividade bacteriostática e bactericida dos extratos brutos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de <i>Miconia affinis</i> , <i>Miconia caiuia</i> e <i>Miconia pyrifolia</i> na concentração inicial de 30 mg/mL.....	56
Tabela 9- Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos extratos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de <i>Miconia caiuia</i> (mg/ mL) em isolados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> Oxacilinas Resistentes (ORSAS) – UFPEDA.....	59
Tabela 10- Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos extratos em hexano (HEX), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de <i>Miconia caiuia</i> (mg/mL) em isolados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> - TESTE D+ (UFPEDA)	59
Tabela 11- Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos extratos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de <i>Miconia caiuia</i> (mg/ mL) em isolados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> com perfil de sensibilidade ou resistência à clindamicina e eritromicina – UFPEDA.....	60

Tabela 12- Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos extratos em hexano (HEX), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de <i>Miconia caiuia</i> (mg/ mL)	61
Tabela 13- Rendimento das frações do extrativo de <i>M. caiuia</i>	63
Tabela 14- Dados da análise do cromatograma da Fração 20.....	64
Tabela 15- Elucidação das estruturas químicas presentes na Fração 20.....	65
Tabela 16- Dados da análise do cromatograma da Fração 21.....	66
Tabela 17- Elucidação das estruturas químicas presentes na Fração 21.....	67
Tabela 18- Dados do cromatograma da Fração 24.....	69
Tabela 19- CI_{50} das frações em hexano (Hex) de <i>Miconia caiuia</i> em células neoplásicas, através do ensaio colorimétrico MTT, após 72 horas de tratamento	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^1H -RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
^{13}C -RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
AAR	Álcool-ácido-resistente
ABTS	2,2 AZINO BIS - (3-etilbenzo-tiazolina-6-ácido sulfônico
AcOEt	Acetato de etila
AMH	Ágar Müeller–Hinton
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CaCl_2	Cloreto de cálcio
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CE_{50}	Concentração efetiva 50%
CG- EMs	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CH_2Cl_2	Diclorometano
CI_{50}	Concentração inibitória 50%
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMF	Concentração Mínima Fungicida
CMH	Caldo Muller Hinton
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CMM	Concentração Mínima Microbicida
CNS-MS	Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde
CO_2	Dióxido de carbono
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO	Dimetilsufóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAT/g	Equivalência de ácido tânico por miligrama
HEp-2	Carcinoma de laringe humana
HL-60	Leucemia promielocítica aguda
HT-29	Câncer de cólon humano
Hex	Hexano
IMA-MAC	Herbário do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K ₂ SO ₃	Persulfato de potássio
K562	Leucemia mieloide crônica
LC-EI-MS	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetro e Ionização de massas
LPS	Lipopolissacarídeos
MCF-7	Adenocarcinoma de mama
MeOH	Metanol
MOLT-4	Leucemia linfoblástica aguda
MS	Ministério da Saúde
MTT	Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NCI-H292	Carcinoma de pulmão humano
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORSA	Staphylococcus aureus Oxacilina Resistente
PBS	Tampão Fosfato Salino
QPN	Química de Produtos Naturais

RBMA	Reserva da Biosfera da Mata Atlântica
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RPM	Rotação por minuto
RPMI-1640	Meios Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro Fetal Bovino
TFTs	Teor de Fenóis Totais
TMS	Tetrametilsilano
TTTs	Teor de Taninos Totais
UFC	Unidade formadora de colônias
UFPEDA	Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVOS.....	20
1.1.1	Objetivo Geral.....	20
1.1.2	Objetivos Específicos	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS.....	21
2.1.1	Família Melastomataceae	21
2.1.2	Gênero <i>Miconia</i> Ruiz & Pav.....	22
2.1.3	<i>Miconia affinis</i> DC.....	23
2.1.4	<i>Miconia caiuia</i> E. C. O. Chagas & R. Goldenb.....	23
2.1.5	<i>Miconia pyrifolia</i> Naudin.....	24
2.1.6	Uso popular, atividades biológicas e constituintes químicos de espécies de <i>Miconia</i>.....	25
2.2	CÂNCER.....	25
2.2.1	Terapia Anticancerígena	28
2.3	ANTIBIÓTICOS E A RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	29
3	METODOLOGIA.....	35
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	35
3.2	MATERIAL VEGETAL	35
3.3	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	35
3.4	TRIAGEM FITOQUÍMICA- CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD).....	35
3.5	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS (TFTS) E DO TEOR DE TANINOS TOTAIS (TTTS)	36
3.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	36
3.6.1	Atividade sequestradora de radicais livres pelo método DPPH.....	37

3.6.2	Atividade sequestradora de radicais livres pelo método ABTS	37
3.6.3	Atividade sequestradora de radicais livres pelo método do fosfomolibdênio.....	38
3.7	LINHAGENS CELULARES E CULTIVO.....	38
3.7.1	Atividade citotóxica frente a linhagens cancerígenas	39
3.8	ATIVIDADE HEMOLÍTICA	39
3.9	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA MICRORGANISMOS UTILIZADOS .	40
3.9.1	Seleção antimicrobiana: Teste de difusão em disco de papel	41
3.9.2	Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Microbicida (CMM).....	41
3.10	ESTUDO QUÍMICO	41
3.10.1	Métodos Cromatográficos: Coluna aberta com fase sílica gel	42
3.10.2	Identificação estrutural	42
3.10.3	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas	42
3.10.4	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetro e Ionização de massas	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	IDENTIFICAÇÃO DOS MATERIAIS BOTÂNICOS	43
4.2	EXTRATOS VEGETAIS	43
4.3	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	44
4.4	QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS (TFTS) E TEOR DE TANINOS TOTAIS (TTTS)	46
4.5	ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES PELO MÉTO- DO DPPH, ABTS E FOSFOMOLIBDÊNIO	47
4.6	CITOTOXICIDADE	48
4.6.1	Citotoxicidade em células cancerígenas	48
4.7	ANÁLISE DA RUPTURA DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA.....	53
4.8	ANTIMICROBIANA	53

4.8.1	Teste por Difusão em Disco de papel	53
4.8.2	Concentração Mínima Inibitória- CMI e Concentração Mínima Microbicida- CMM	56
4.9	QUÍMICA	61
4.9.1	Coluna cromatográfica líquida aberta recheada com sílica	61
4.9.2	Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de massas	63
4.9.3	Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas- LCMS.....	72
5	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos de origem vegetal em estudos químicos e biológicos tem sido realizada nos últimos anos com o intuito de encontrar compostos biologicamente ativos para a síntese e o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos que minimizem os efeitos tóxicos causados por parte dos medicamentos disponíveis (PATWARDHAN et al.; 2004; MACIEL, et al.; 2002). De fato, as plantas possuem uma ampla gama de metabólitos secundários que apresentam as mais diversas e complexas estruturas químicas produzidas por diferentes vias biossintéticas (LEWINSOHN, GIJZEN; 2009). Essas estruturas pertencem a classes de compostos como terpenos, flavonoides, alcaloides, cumarinas, dentre outras, que apresentam inúmeras atividades biológicas (DEWICK, 2002; CUNICO et. al., 2004). Adicionalmente, vários estudos têm demonstrado o potencial terapêutico de novas moléculas de origem vegetal como agentes antimicrobianos (MICHELIN et al., 2005), antioxidantes e mutagênicos (ZAHIN, et al., 2010).

Neste contexto, vale destacar que o Brasil possui elevada diversidade biológica distribuída nos biomas Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Este último é amplamente estudado devido à variedade de espécies vegetais endêmicas e à abundância de recursos naturais, mostrando-se promissor no desenvolvimento de novas pesquisas (LEWINSOHN, PRADO; 2002; DRUMMOND, et al.; 2005).

Dentre as espécies endêmicas encontradas na Mata Atlântica estão aquelas pertencentes à família Melastomataceae. Na família Melastomataceae, o gênero *Miconia* é o maior, com mais de 1.056 espécies, ocorrendo principalmente nas áreas tropicais e nos mais variados biomas no Brasil, incluindo o cerrado, a caatinga, a floresta amazônica e a mata atlântica (GOLDENBERG, 2000; BAUMGRATZ; CHIAVEGATTO, 2006; GOLDENBERG, 2012). No Nordeste encontram-se 74 espécies de *Miconia*, presentes majoritariamente na Mata Atlântica, sendo Pernambuco o segundo estado em percentagem de espécies presentes (FORZZA et al., 2010).

Na literatura, encontram-se relatos do uso popular de espécies de *Miconia* no tratamento de reumatismo, resfriado e febre (CRUZ; KAPLAN, 2004); ações antisséptica, cicatrizante e para afecções da garganta (FENNER et al., 2006).

Estudos biológicos com os extratos brutos e compostos isolados de algumas espécies de *Miconia* comprovaram as atividades antimicrobiana (CUNHA et. al., 2010), analgésica (VASCONCELOS et. al., 2003; CUNHA et. al., 2003), leishmanicida (PEIXOTO et.al., 2011), antioxidantes (PIERONI et. al., 2011), purificação sanguínea (BUSMANN et. al.,

2010) e antitumoral (QUEIROZ et. al., 2011). Entre os compostos químicos isolados de espécies de *Miconia* estão cumarinas, triterpenos e quinonas (LOWRY, 1968; MACARI et al., 1990; GUNATILAKA et al., 2001).

A investigação do potencial terapêutico de algumas espécies de *Miconia* e/ou de seus compostos isolados tem demonstrado resultados promissores. Diante do que foi exposto, este trabalho visa contribuir para o conhecimento químico e farmacológico de espécies vegetais ainda pouco estudadas como *Miconia affinis*, *Miconia caiuia* e *Miconia pyrifolia*, buscando a descoberta de novos medicamentos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar as atividades biológicas dos extratos brutos de *Miconia affinis*, *Miconia caiuia* e *Miconia pyrifolia* e isolar os compostos químicos presentes nos extratos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos brutos de *Miconia affinis*, *Miconia caiuia* e *Miconia pyrifolia*;
- Determinar o perfil fitoquímico dos extratos brutos;
- Investigar a citotoxicidade dos extratos sobre células cancerígenas humanas;
- Verificar o potencial de hemólise dos extratos em estudo;
- Avaliar a suscetibilidade antimicrobiana dos extratos brutos frente a micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos e leveduriforme;
- Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos frente aos microrganismos testes;
- Avaliar o extrato mais ativo frente a isolados de ORSA, Teste D⁺ e Perfil de resistência à clindamicina;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos de *Miconia*;
- Quantificar as concentrações de compostos fenólicos totais e taninos dos extratos de *Miconia*;
- Fracionar o extrato que se mostrou mais ativo e não apresentou toxicidade;
- Analisar os metabólitos secundários dos extratos em acetato de etila e metanol da espécie vegetal que apresentou melhor atividade;
- Isolar, purificar e identificar estruturalmente os compostos químicos;

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

A utilização de plantas medicinais pelo homem como opção terapêutica para o tratamento das afecções é uma prática empírica comum desde os tempos imemoriais. A medicina popular no Brasil é o reflexo do conhecimento transmitido entre as gerações de diferentes povos e imigrantes que difundiram o seu conhecimento sobre a utilização e o aprimoramento da flora medicinal, tornando as plantas medicinais importantes instrumentos na assistência farmacêutica (BRASIL, 2006).

Mesmo com os avanços da medicina moderna, o homem continua buscando na natureza recursos que lhes proporcionem melhorias nas condições de vida e de sua saúde. Dados registrados pelo Ministério da Saúde (MS) relatam o acréscimo de 161 % entre os anos de 2013-2015 na busca pela população por tratamentos à base de plantas medicinais e fitoterápicos, ressaltando a importância dos estudos na descoberta de novos princípios ativos provenientes de produtos naturais (BRASIL, 2016).

Os fitoterápicos são medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal como constituintes ativos. Estes constituintes ativos são substâncias ou classes de substâncias caracterizadas quimicamente as quais são atribuídas ação farmacológica e terapêutica do medicamento. Regulamentados por intermédio da Resolução da Diretoria Colegiada- RDC Nº 48 de 2004, os fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela constância de sua qualidade e segurança que podem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, publicações técnico-científicas ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos (ANVISA, 2004).

2.1.1 Família Melastomataceae

A diversidade em espécies arbóreas e arbustivas da família Melastomataceae A. Juss tem impulsionado pesquisadores das diversas áreas do conhecimento a explorar o potencial químico e farmacológico das espécies vegetais que compõe esta família, com a perspectiva em encontrar novos agentes terapêuticos. A família Melastomataceae apresenta cerca de 200 gêneros e 5000 espécies ainda pouco estudadas, e destaca-se das demais angiospermas por sua abundância vegetal podendo ser encontrada em ambientes predominantemente tropicais (SOUZA; LORENZI, 2008; RENNERT, 2010; GOLDENBERG, 2012).

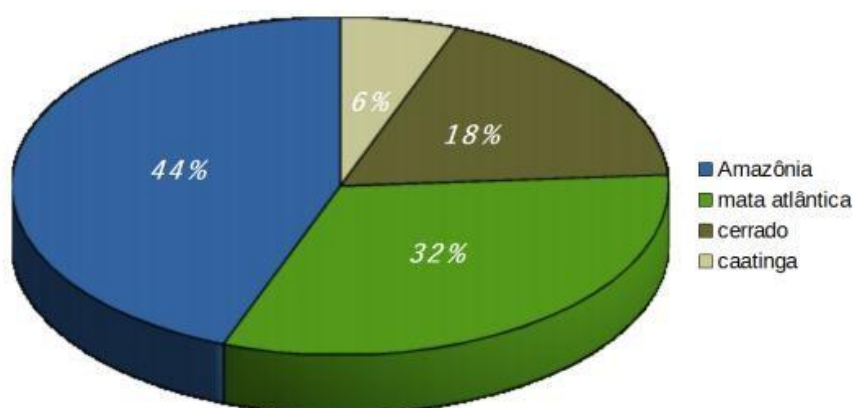
No Brasil, aproximadamente 1.500 espécies de Melastomataceae estão distribuídas

entre domínios da Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica, destas, quase 50% do total das espécies estão presentes no bioma da Mata Atlântica (BAUMGRATZ et al., 2015). Adicionalmente, a família apresenta dentre outras características a peculiaridade de tendência ao endemismo e a consequente biossíntese única presente nestas espécies o que para a Química de Produtos Naturais (QPN) é um atrativo e vasto campo de pesquisas para a descoberta de novas moléculas (GOLDENBERG, 2000; LEITE, 2009).

2.1.2 Gênero *Miconia* Ruiz & Pav.

Entre os diversos gêneros de Melastomataceae, o gênero *Miconia* destaca-se por apresentar mais de 1.056 espécies descritas em todo o mundo representando $\frac{1}{4}$ das espécies de Melastomataceae (GOLDENBERG, 2012). *Miconia* foi descrito pela primeira vez por Ruiz e Pavón em 1974. Sendo exclusivamente neotropical, espécies do gênero *Miconia* são encontradas em toda a América, desde o sul do México até o norte da Argentina e Uruguai (GOLDENBERG, 2000). Em território brasileiro, aproximadamente 300 espécies de *Miconia* estão distribuídas nos mais variados biomas como Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga (Figura 01), desde o nível do mar nas restingas até os campos de altitude (BAUMGRATZ; CHIAVEGATTO, 2006).

Figura 1: Distribuição das espécies de *Miconia* nos biomas brasileiros



Fonte: GOLDENBERG, 2015.

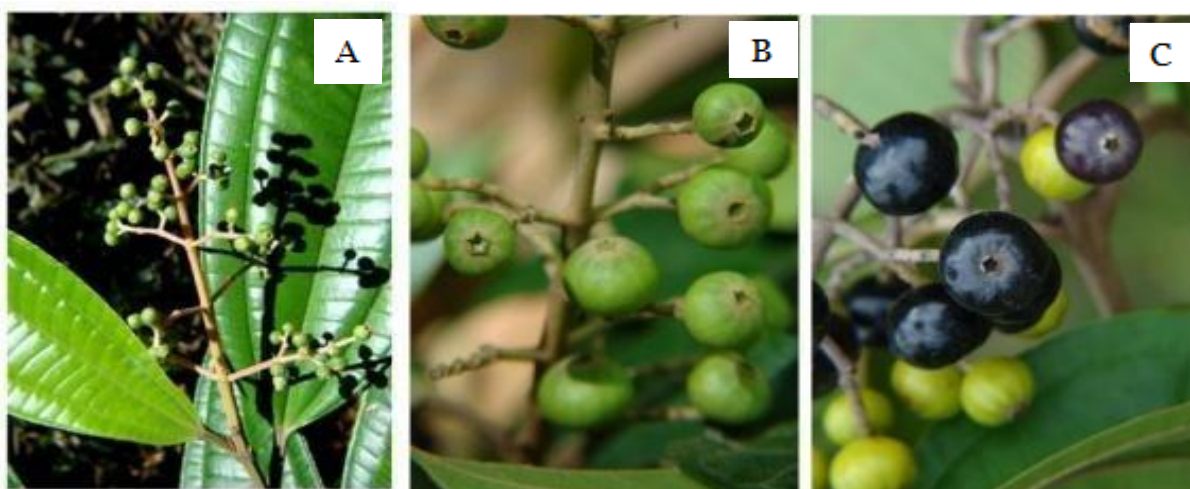
Diante da preferência das espécies do gênero *Miconia* pelo Bioma da Mata Atlântica, as espécies estudadas neste trabalho foram coletadas nas restingas da Mata Atlântica, onde segundo Baumgratz e colaboradores (2015) se encontram cerca de 45 % das espécies de *Miconia* do Brasil.

2.1.3 *Miconia affinis* DC.

Miconia affinis é conhecida popularmente no Brasil como “jacatira-branca” e está distribuída geograficamente desde o Sul do México até o Sudeste do Brasil. A preferência por solos úmidos e profundos, matas ciliares, mata de planície e encostas são características desta espécie. Presente em todo Nordeste, *M. affinis* é conhecida popularmente em Pernambucano como “casquinho” (CHAGAS, 2012).

Como todas angiospermas, *M. affinis* também apresenta período de inflorescência entre os meses de março e abril e infrutescência de setembro a dezembro, conforme mostra a Figura 02. Devido algumas semelhanças morfológica e fenotípica das flores e folhas de *M. affinis* com a espécie *Miconia prasina*, ambas são confundidas com frequência (REZENDE; ROMERO; GOLDENBERG, 2014).

Figura 2: *Miconia affinis* no período de inflorescência (A) e infrutescência (B e C).

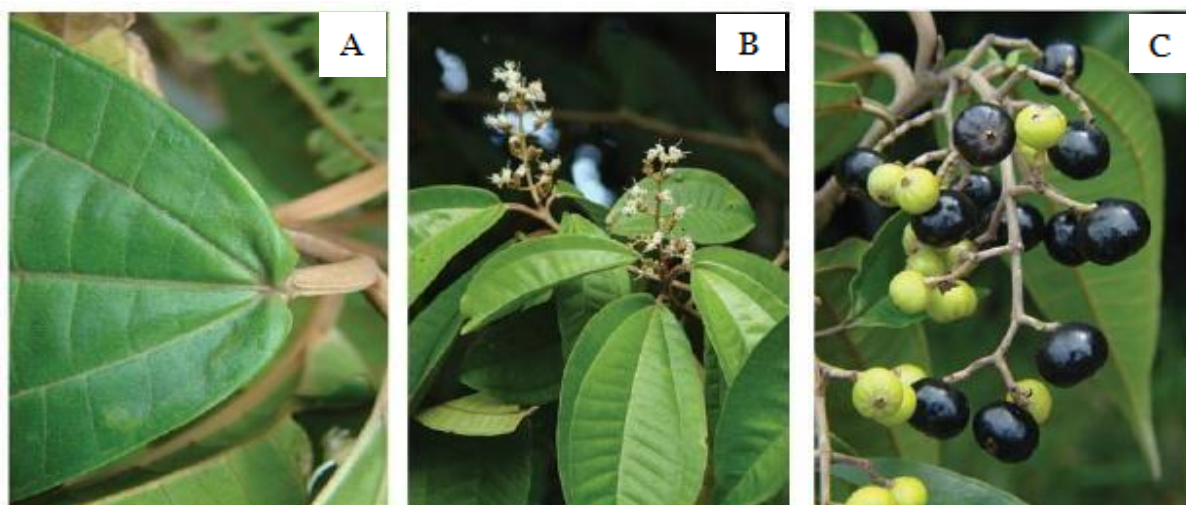


Fonte: CHAGAS, 2012

2.1.4 *Miconia caiuia* E. C. O. Chagas & R. Goldenb.

Miconia caiuia, espécie recentemente identificada, é encontrada nas florestas submontanhosas úmidas ameaçadas de extinção nos estados de Alagoas, Pernambuco e norte da Bahia. *M. caiuia* é chamada popularmente por “caiuiá” e “carrasco” em Alagoas e; na Bahia é conhecida por “munduru” e em Pernambuco como “pau-mondé”. Esta espécie floresce de outubro a janeiro, apresentando frutos do mês de janeiro - maio. De origem indígena, caiuia significa “aquele que vive na floresta” ou da “floresta”, sendo endêmica no Nordeste, encontrada ao longo da costa conforme mostra a Figura 03 (CHAGAS, 2013).

Figura 3: *Miconia caiuia* no período de inflorescência (A e B) e infrutescência (C).



Fonte: CHAGAS; BARBOSA; GOLDENBERG, 2013

2.1.5 *Miconia pyrifolia* Naudin

Miconia pyrifolia ou “tinteiro-branco” distribui-se pelo sudeste da Venezuela, Peru, Brasil, Guiana e Suriname. Habitando florestas ciliares, úmidas de encosta e estacionais de planície, esta espécie floresce e frutifica entre os meses de novembro a maio. No estado de Alagoas, *M. pyrifolia* é conhecida popularmente por “caiubim”, “caramondé”, “caubim”, “cauia” e “gramundé”; também é confundida frequentemente com *Miconia minutiflora* e *Miconia cinnamomifolia* (CHAGAS, 2012). A Figura 4 mostra a espécie *M. Pyrifolia* fotografada durante a coleta.

Figura 4: Partes áreas de *M. pyrifolia* Naudin (A) e (B).



Fonte: O AUTOR.

2.1.6 Uso popular, atividades biológicas e constituintes químicos de espécies de *Miconia*

Poucos estudos relatam a utilização de *Miconia* na medicina popular. Cruz e Kaplan (2004) verificaram que a população faz uso de algumas espécies de *Miconia cinnamifolia* (DC.) Naudin para auxiliar no tratamento de resfriado e febre. Fenner e colaboradores (2006) também estudaram a utilização de plantas medicinais e descreveram as espécies *Miconia aplostachya* (Bonpl.) DC. e *Miconia albicans* (Sw.) Tr. para o tratamento das afecções da garganta, cicatrização, antisséptico, eupéptica e antirreumática.

Entretanto, diversos estudos descritos na literatura comprovaram as atividades biológicas de diferentes espécies de *Miconia* como o potencial antioxidante de *M. albicans* (PIERONI et al., 2011); antimicrobiano de *M. latecremata* (GONTIJO et al., 2013), *M. minutiflora* (ARAÚJO, 2011), *M. rubiginosa* (QUEIROZ et al., 2011) e *M. lugustroides* (CUNHA et al., 2010); anti- inflamatório de *M. calvescens* (BARDON et al., 2007) e *M. albicans* (VASCONCELOS et al., 2006); antitumoral de *M. rubiginosa* (QUEIROZ et al., 2011) e *M. fallax* (CUNHA et al., 2008); antiviral de *M. stenostachya* e *M. fallax* (CUNHA et al., 2008); analgésico de *M. rubiginosa* (SPESSOTO et al., 2003); tripanocida de *M. cabucu* (LEITE, 2009); leishmanicida de *M. langsdorffii* (PEIXOTO et al., 2011); genotóxica e mutagênica de *M. genus* (SERPELONI et al., 2011), ressaltando a importância da continuidade de estudos com outras espécies do gênero.

Do ponto de vista químico, os compostos majoritários isolados entre as espécies de *Miconia* foram quinonas: *M. lepidota* (GUNATILAKA et al., 2001); terpenos: *M. cabucu* e *M. albicans* (CREVELIN et al., 2006) e flavonoides: *M. prasina* e *M. rubiginosa* (TARAWNEH, 2014; RODRIGUES, 2011).

Neste cenário, justifica-se a avaliação das atividades biológicas de *Miconia affinis*, *Miconia caiuia* e *Miconia pyrifolia* visto que, ainda não há estudos químicos e farmacológicos destas espécies, sendo este trabalho o primeiro relato.

2.2 CÂNCER

Câncer é um conjunto de mais de 100 patologias que partilham do crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos. Na proliferação descontrolada e independente dessas células estão envolvidos alguns genes que participam dos fatores de regulação do crescimento e diferenciação celular normal. A perda do controle biológico natural leva as células a se dividirem rapidamente, adquirindo novas características como a

autossuficiência na sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores de crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão tecidual e metástases (Figura 5) (HANAHAAN; WEINBERG, 2000).

Figura 5: Características adquiridas pelo câncer



Fonte: Adaptado de HANAHAAN; WEINBERG, 2000.

O resultado destas alterações (marcos do câncer) são células com comportamentos biológicos distintos das células normais. Estas células podem apresentar morfologia celular anormal devido à incapacidade da célula diferenciar-se; angiogênese tumoral, que é o surgimento de novos vasos sanguíneos para suprimento dessas novas células, sendo este, resultado dos estímulos das próprias células tumorais sobre as células endoteliais que estão envolta do tumor; metástases: provenientes de células tumorais imóveis que adquiriram condições de mobilidade com alta capacidade de multiplicação e potencial invasor, proporcionando a migração dessas células para outras partes do organismo; e o antiapoptose, onde as células neoplásicas rejeitam os sinais de morte e cedem espaços para as células normais recém-produzidas (BRASIL, 2012; GRIFFITHS et al., 2008; NAOUM, 2015).

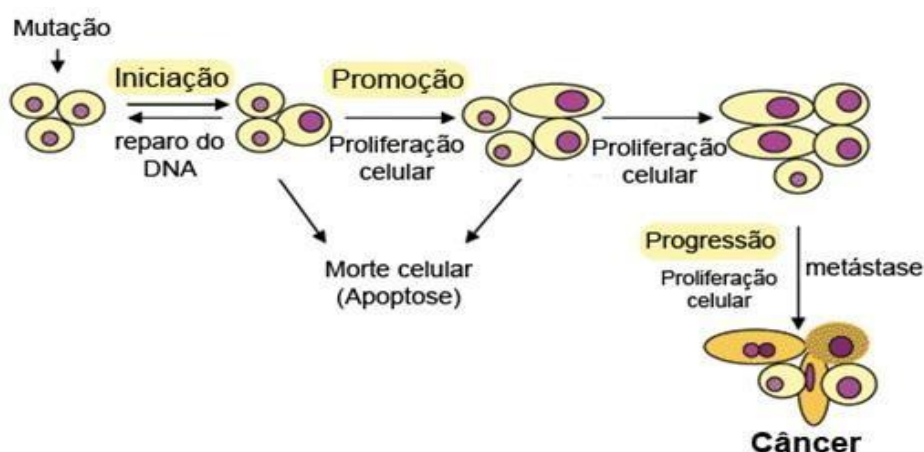
Durante anos, o câncer foi caracterizado como uma doença própria dos países desenvolvidos. No entanto, nas últimas décadas ela vem se expandindo por todo o mundo, atingindo tanto as grandes potências quanto os países em desenvolvimento. Por isso, o câncer tem-se apresentado como um relevante problema de saúde pública a nível mundial. Os

impactos sociais e econômicos desta doença na sociedade são preocupantes, uma vez que resultam em altos índices de morbidade e mortalidade, além de gastos onerosos para o tratamento na rede pública (BRASIL; 2011).

A elevada incidência do câncer tem preocupado a Organização Mundial da Saúde-OMS, levando-a a promover ações na saúde que auxiliem na prevenção e no tratamento da doença. Dados do Instituto Brasileiro do Câncer (INCA) estimam que nos anos 2016 e 2017 sejam registrados 596 mil novos casos de câncer no Brasil, sendo pouco mais de 300.000 em mulheres. Na região do nordeste brasileiro o câncer de próstata e de mama incide em 51,84 para cada 100 mil habitantes homens e 38,74 para 100 mil habitantes mulheres, ocupando ambos, a primeira posição do *ranking* de patologias de origem cancerígena. Além destes, os tipos de câncer mais incidentes são o de pele não melanoma, cólon e reto, pulmão e estômago (BRASIL, 2016).

O processo que leva a formação do câncer, desde as alterações no genoma até a formação do tumor, é denominado carcinogênese ou oncogênese. Estas alterações levam a célula a uma evolução progressiva de alterações na sua capacidade de proliferação, diferenciação, sobrevivência e interativa com o meio ambiente. A etapa dessas alterações é dividida em três estágios: iniciação, promoção e proliferação ou progressão celular (Figura 6) (ROCHA; SILVA, 2003).

Figura 6: Processo de desenvolvimento de uma célula cancerígena.



Fonte: Adaptada do INCA (1996).

A iniciação representa a primeira etapa do processo de carcinogênese e refere-se ao momento em que ocorre o desvio do genoma ocasionando as mutações no DNA celular, devido à ação de fatores carcinogênicos. Com as mutações, a célula torna-se mais “susceptível”

devido à perda de controle dos fatores de crescimento celular, fatores de diferenciação e apoptóticos. Essas células “iniciadas” permanecem latentes, até que sofram a ação dos agentes promotores, sendo estas alterações irreversíveis, porém o fenótipo no genoma alterado ainda não está expresso (KUMMAR, 2005).

Durante a promoção, os agentes oncopromotores atuam na célula que já está alterada, fazendo-a adquirir as vantagens proliferativas, devido a interação dos fatores de crescimento, citocinas e seus respectivos receptores com a capacidade de não responder mais aos mecanismos de controle do organismo, tornando-se então, uma célula maligna. Por fim, durante a progressão, as células malignas provenientes de diversas mutações biológicas apresentam o fenótipo característico e multiplicam-se de forma agressiva com grande potencial de invasão e disseminação, sendo este processo irreversível (BRASIL, 2012; MELO et al., 2012).

As causas que induzem ao câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. No entanto, em ambos os casos, verifica-se a indução de alterações mutagênicas e não mutagênicas ou epigenéticas nas células (BRASIL, 2012). Vários são os agentes carcinogênicos e eles dividem-se em três categorias: carcinógenos químicos, físico e biológico (BRASIL, 2012; MELO et al., 2012; SMITH; OERTLE; PRATO, 2014).

2.2.1 Terapia Anticancerígena

A partir de várias abordagens terapêuticas combinadas, é possível realizar o tratamento do paciente com câncer. A cirurgia, a radioterapia, a hormonioterapia e a quimioterapia são os tratamentos básicos e comuns para vários tipos de câncer que isolados ou combinados entre si atuam em diferentes estágios da célula tumoral, dependendo do tipo do tumor (BRASIL, 2012; CARVALHO; TIRNAUER; PELLMAN, 2003).

A cirurgia é a forma de tratamento mais antiga e baseia-se na remoção do tumor, quando este é localizado e encontra-se em condições anatômicas favoráveis, entretanto é considerado apenas um método paliativo. A radioterapia utiliza diferentes radiações ionizantes (raios-X ou raios γ) e é indicada, principalmente, para o tratamento loco-regional do câncer que atinge as células neoplásicas que não podem ser totalmente removidos cirurgicamente ou para aqueles que costumam reincidir após o processo cirúrgico. Já a hormonioterapia consiste na introdução de substâncias análogos ou inibidoras de hormônios para tratar as neoplasias sensíveis aos hormônios presentes no organismo (BRASIL, 2012;

SANTOS et al., 2010).

De todas as terapias citadas acima, a quimioterapia ainda é a forma de tratamento mais utilizada e consiste na administração regular de fármacos que interferem no processo de crescimento e divisão celular de células cancerígenas. A quimioterapia é baseada na combinação de diferentes fármacos (poliquimioterapia) atuando em subpopulações de células tumorais em distintos estágios de desenvolvimento (SAWADA et al., 2009).

Adicionalmente, alguns quimioterápicos e antibióticos também podem atuar sobre as células cancerígenas inibindo a síntese proteica ou agindo a nível de membrana, promovendo a morte das células e impedindo a progressão do câncer (BRASIL, 2016). Apesar de ser a terapia mais utilizada, a maioria dos fármacos utilizados na quimioterapia não possui especificidade, lesionando tanto tecidos saudáveis quanto os mutantes, além de contribuírem para o surgimento de efeitos colaterais como náuseas, vômitos, anemia, mielossupressão, imunossupressão, alopecia, toxicidade renal, toxicidade pulmonar, neurotoxicidade, entre outras (SAWADA et al., 2009).

Normalmente a quimioterapia é utilizada como adjuvante, após cirurgia ou radioterapia, ou como paliativo visando melhorar a qualidade de vida do paciente (BRASIL, 2012). Sendo assim, faz-se necessário a busca de novos compostos bioativos, associados aos conhecimentos dos processos genéticos e bioquímicos, para que estes possam atuar sobre os mecanismos celulares e induzam o bloqueio da proliferação dessas células cancerígenas, para a descoberta de novas estratégias de tratamento da doença.

2.3 ANTIBIÓTICOS E A RESISTÊNCIA BACTERIANA

Os antibióticos são medicamentos de origem natural ou sintética com capacidade de inibir parcial ou totalmente o crescimento e a multiplicação dos micro-organismos (WALSH, 2004). Os fármacos antimicrobianos possuem uma importância terapêutica que se estende desde o tratamento de infecções até ao suporte em cirurgias, em transplante de órgãos e em terapias anticancerígenas. Entretanto, esses medicamentos se destacam por serem os mais utilizados pela clínica para tratar algum tipo de infecção bacteriana (BRITO; CORDEIRO; 2012; WHO, 2012).

Alguns antimicrobianos, por possuir a capacidade de inibir o crescimento celular, são utilizados para auxiliar no tratamento do câncer. Os antibióticos antitumorais mais conhecidos são antraciclina. Esta classe de moléculas se ligam aos fosfolipídios presentes na membrana celular, modificando a fluidez e consequentemente a entrada e saída de íons. Além disso,

esses antibióticos também induz a formação de radicais livres de oxigênio e semiquinona como resultado do processo de redução enzimática. E por fim, a indução de ligações interfilamentares com o material genético, bloqueando a síntese do RNA e DNA e o desaceleramento da atividade da topoisomerase II, causando a quebra dos filamentos do DNA (ALMEIDA, et al, 2005; CULLINANE; CUTTS, VANROSMALLEN, 1994).

O desenvolvimento de antimicrobianos com amplo espectro de ação proporcionou um tratamento diversificado e cada vez mais eficaz contra as doenças infecciosas, porém, a ausência da análise criteriosa para a utilização desses medicamentos atrelados ao uso excessivo, favoreceu o aparecimento e a disseminação de espécies microbianas com múltiplas resistências à ação das drogas (ANDRADE et al., 2006; AQUINO; BARROS; SILVA; 2010).

Com a intenção de propor o uso racional de antimicrobianos e minimizar o índice no registro de casos de resistência bacteriana, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina através da Resolução da Diretoria Colegiada- RDC 44/2010, que a venda de antibióticos seja controlada com retenção de receita nas farmácias e drogarias (ANVISA, 2010).

O uso excessivo e descontrolado dos medicamentos, a dificuldade do diagnóstico e as péssimas condições de higiene são fatores que contribuem para o índice de resistência aos antibióticos. Por esse motivo, tem se elevado os estudos farmacológicos na busca por substâncias que sejam nocivas a essas bactérias potencialmente perigosas, e que estas substâncias atuem impedindo a transdução de sinais e a plasticidade gênica bacteriana, com o intuito de erradicar essas superbactérias (PEÑA et al., 2015; ROE, 2008; VON NUSSBAUM et al., 2006).

A resistência microbiana é definida como um mecanismo de defesa desenvolvido pelos microrganismos, podendo apresenta-se de forma intrínseca ou adquirida, com capacidade de diminuir ou inativar a ação dos fármacos (ARIAS; CARRILHO, 2012).

A resistência intrínseca também denominada de resistência natural, é a capacidade inata de determinada espécie bacteriana resistir ao antibiótico. Esse tipo de mecanismo está relacionado a diversas proteínas envolvidas em processos bioquímicos e fisiológicos, inibindo a ação do fármaco, devido à ausência de um alvo específico (MARTÍNEZ, 2012).

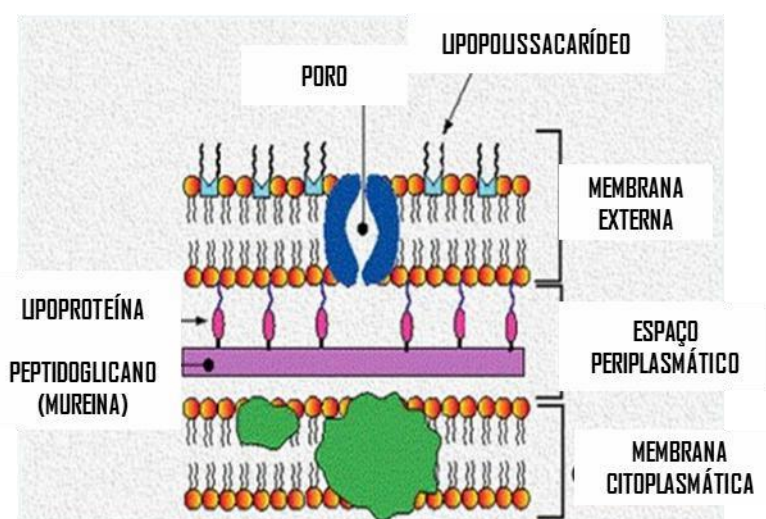
A resistência adquirida é desenvolvida pelos microrganismos após exposições sucessivas aos antibióticos e podem apresentar-se de quatro formas: alteração na permeabilidade da membrana externa, alteração do sítio de ação do antimicrobiano, bomba de efluxo e inativação enzimática (BLAIR et al.; 2015).

A ação dos antimicrobianos e os mecanismos de resistência desenvolvidos pelos

agentes patogênicos variam conforme a classe de antibióticos empregada, a exemplo os antibióticos β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenems e monobactams) que atuam diretamente na biossíntese dos peptidoglicanos (responsáveis pela integridade da parede bacteriana) e apresentam mecanismos de resistência bacteriana desenvolvidos pela hidrólise do anel β -lactâmico, por Bomba de efluxo ou alteração do local-alvo, diferente dos Aminoglicosídeos (gentamicina, amikacina, estreptomicina e tobramicina), que atuam inibindo a síntese proteica bacteriana bloqueando a continuação da tradução com mecanismos de resistência através dos processos de fosforilação, acetilação, efluxo ou alteração do alvo (DAVIES, DAVIES; 2010)

A permeabilidade da membrana celular bacteriana é uma característica essencial para que o antibiótico apresente o efeito desejado, seja ele bactericida ou bacteriostático. As bactérias Gram- negativas são intrinsecamente menos permeáveis aos antibióticos e isso é devido à presença de uma membrana externa que impede a difusão e, consequentemente, a ação dos antibióticos em seu citoplasma (DELCOUR, 2009). Alterações no sítio de ligações entre a membrana externa com o LPS resultam no aumento da permeabilização da membrana externa, permitindo a absorção de agentes antimicrobianos na célula bacteriana (Figura 7) (DELCOUR, 2009; GOODMAN; GILMAN'S, 2008; HANCOCK, 1984).

Figura 7: Estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas.

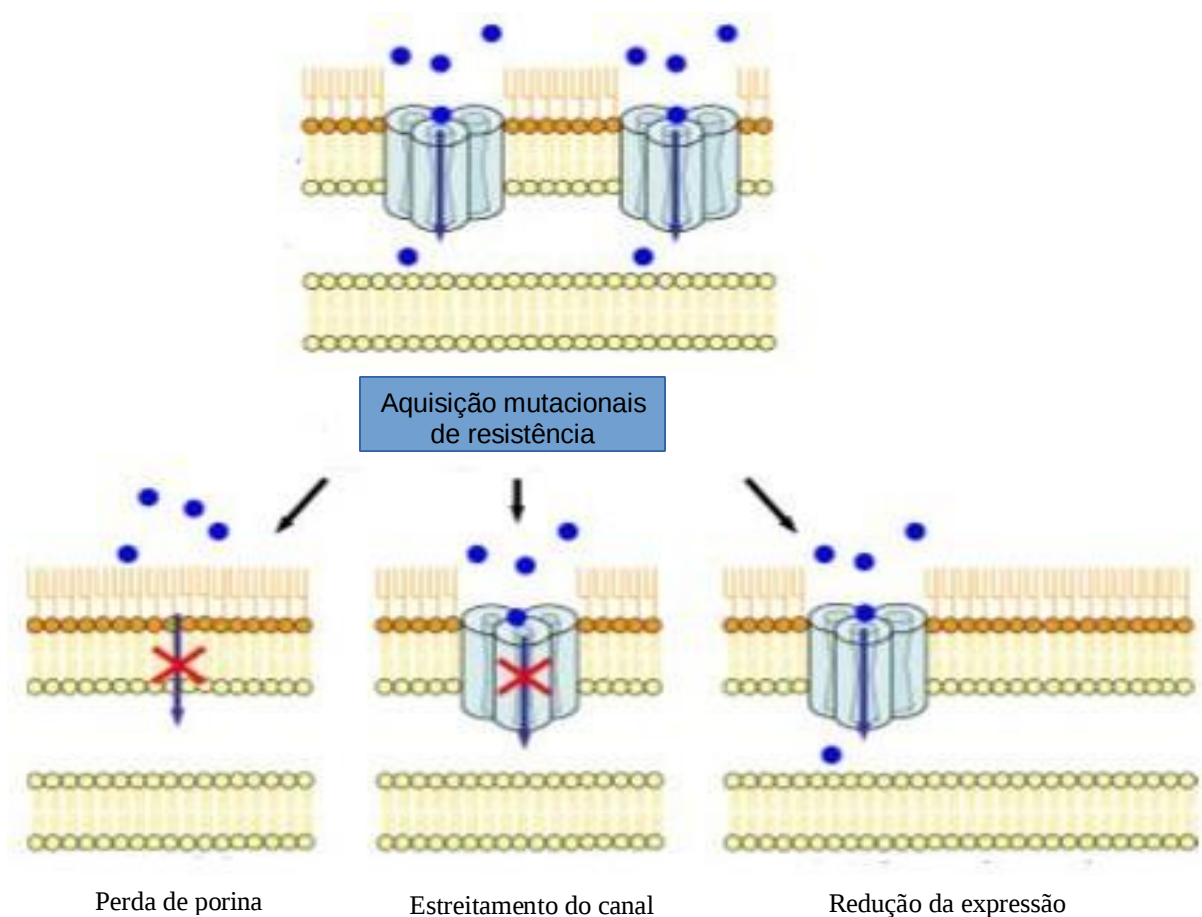


Fonte: http://phmb.info/antisepsia_e_antissepticos.html (adaptada)

Outro mecanismo ligado à membrana externa é a perda ou a regulação negativa das porinas. As porinas são proteínas que formam canais entre as membranas externa e interna que permitem a passagem de moléculas de pequeno peso molecular, tais como peptídeos e

agentes antimicrobianos. Modificações no número de cópias, tamanho, na seletividade e mutações que alterem a expressão e/ou função das porinas na membrana externa da célula altera a permeabilidade e, conseqüentemente, a sensibilidade aos antibióticos (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012; HANCOCK, 1984). Esse tipo de mecanismo é obtido através do uso de antibióticos como β - lactâmicos que penetram na membrana externa de bactérias Gram-negativas via porinas (Figura 8), como, por exemplo, tetraciclina e fluoroquinolonas (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012).

Figura 8: Alterações na estrutura das porinas.



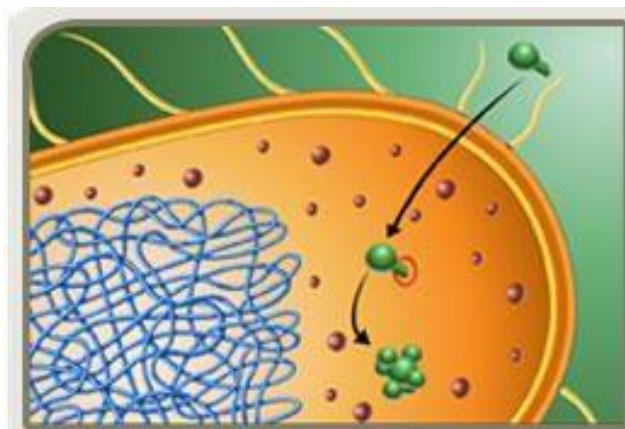
Fonte: Fernández; Hancock (2012).

O mecanismo que envolve a alteração no sítio de ação caracteriza-se pela ausência ou diminuição da afinidade entre o antibiótico e o local de ligação na célula bacteriana, ocasionada pela aquisição de genes ou mutação. O resultado dessa modificação é o impedimento da ligação do fármaco ao sítio de ação (Figura 9). Este mecanismo pode ser observado na interferência na síntese de proteínas ou na síntese de DNA, devido a

substituições de aminoácidos (BLAIR et al.; 2015; GOODMAN; GILMAN'S, 2008).

Antibióticos como rifamicinas e quinolonas causam mutações na RNA-polimerase e na DNA-girase, respectivamente, que resulta na resistência bacteriana (DZIDIC, SUSKOVIC; KOS, 2008).

Figura 9: Alteração dos sítios-alvo após ligação do antibiótico.



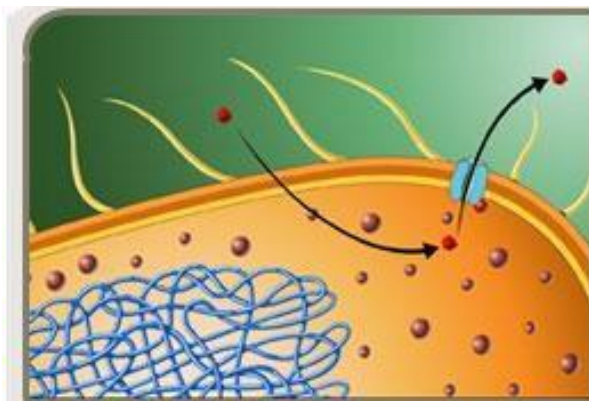
Fonte: ANVISA, 2007.

A bomba de efluxo atua nas células bacterianas expulsando diferentes tipos de produtos químicos, tais como corantes, solventes orgânicos e moléculas desnecessárias ao desenvolvimento do microrganismo. Como mecanismo de resistência, as bombas de efluxo reduzem a concentração do antibiótico dentro das células bacterianas, e por agir de forma lenta, promove tempo suficiente para que a bactéria se adapte e torne-se resistente, por meio de mutações ou alteração do sítio- alvo dos antibióticos (DZIDIC, SUSKOVIC; KOS, 2008; KUMAR; VARELA, 2012).

O mecanismo de ação da bomba de efluxo pode variar de acordo com sua especificidade e mecanismo. Dentre os mecanismos podemos citar: alteração nos reguladores responsáveis pela expressão da bomba de efluxo, as alterações químicas na estrutura do antibiótico, ruptura na montagem estrutural da bomba, e ausência de energia necessária para a atividade da bomba (ASKOURA et al., 2011). Dentre os mecanismos de resistência bacteriana, este é considerado o mais importante e estudado, pois atua em todas as classes de antibióticos, formando sistemas de efluxo capazes de expelir um largo espectro de fármacos estruturalmente não relacionados, auxiliando significativamente para a resistência bacteriana a múltiplas drogas (MDR) (Figura 10). Tanto as bactérias Gram-positivas quanto as Gram-negativas podem possuir uma única bomba de efluxo que atue em um e /ou várias fármacos

(BLAIR, et al. 2015; DZIDIC, SUSKOVIC; KOS, 2008).

Figura 10: Representação dos mecanismos de resistência através da existência de bombas de efluxo.



Fonte: ANVISA, 2007.

Outro tipo de mecanismo é a pela degradação e/ou inativação do antibiótico por enzimas produzidas naturalmente por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. As β -lactamases são um bom exemplo de enzimas hidrolíticas bacteriana que atuam quebrando ligação amida do anel β -lactâmico e, conseqüentemente, desativando as propriedades antibacterianas da molécula (BLAIR, et al. 2015; WRIGHT, 2005). Mais de 200 tipos de diferentes β -lactamases já foram identificadas e classificadas de acordo com suas características funcionais, como por exemplo, o substrato ao qual possui maior afinidade. Essas características são adquiridas através da codificação cromossômica ou transferidas a partir dos plasmídeos de diferentes bactérias (BLAIR, et al. 2015; DZIDIC, SUSKOVIC; KOS, 2008; WRIGHT, 2005).

No entanto, o uso indiscriminado de fármacos antimicrobianos tem aumentado o número de mutações gênicas resultando em uma nova população bacteriana mais resistente, ou co-resistente – microrganismo tolerante às concentrações terapêuticas de mais de uma classe de antimicrobiano (DOYLE et al., 2013). Diante desse contexto, há uma necessidade crescente de reposição de novos antibióticos para suplantarmos a resistência a partir de produtos naturais bioativos e/ou sintéticos, a fim de evitar o surgimento e a proliferação de novas populações microbianas multirresistentes.

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas adotadas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa- CONEP. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco sob o protocolo de número 60107916.80000.5208. Este trabalho encontra-se em concordância com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas com Seres Humanos vigentes na Resolução 466/12 – CNS-MS.

3.2 MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas de *Miconia affinis*, *Miconia caiuia* e *Miconia pyrifolia* foram coletadas no mês de agosto de 2013 em São José da Laje, município que faz parte da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica (RBMA), no Estado de Alagoas. Após a identificação pelo Botânico MSc. Earl Celestino de Oliveira Chagas, as exsiccatas foram depositadas no Herbário do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas (IMA-MAC).

3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Para obtenção dos extratos, as partes aéreas das espécies de *Miconia* foram secas em estufaa 50 °C com renovação constante de ar durante 72 h e o material foi triturado em moinho de facas. Em seguida, para cada 150 g do material vegetal obtido foi utilizado 700 mL de solvente, em ordem crescente de polaridade: hexano (hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH). Os extratos foram obtidos por maceração exaustiva e ao abrigo da luz. Os extrativos foram secos em evaporador rotativo com temperatura controlada (50 °C). O rendimento de cada extrato foi calculado por gravimetria.

3.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA - CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)

A triagem fitoquímica foi realizada como intuito de detectar a presença de metabólitos secundários por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) (WAGNER; BLADT, 2001). Para realização da CCD, os extratos de *M. affinis*, *M. caiuia* e *M. pyrifolia* foram pesados na concentração de 5 mg/mL e dissolvidos nos solventes Hex, AcOEt e MeOH. Como fase estacionária foram utilizadas placas com sílica gel F₂₅₄ e como fase móvel os solventes nas

proporções: hexano:acetato de etila (70:30 v/v), hexano:acetato de etila (50:50 v/v) e hexano:clorofórmio:acetato de etila: metanol (2:3:4:1v/v/v/v). Após a eluição, as placas foram secas e pulverizadas com os reveladores específicos e examinadas sob luz ultravioleta (254 e 365 nm). Alguns reveladores exigiram o aquecimento a 100 °C para visualização das bandas coloridas no ultravioleta ou visível.

3.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS (TFTS) E DO TEOR DE TANINOS TOTAIS (TTTS)

A determinação espectrofotométrica dos compostos fenólicos foi realizada através do método colorimétrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, e o ácido tânico foi utilizado como padrão de referência para construção da curva de calibração. O teor de fenóis residuais também foi quantificado com o reagente Folin-Ciocalteu e o método utilizado foi por precipitação da caseína, onde o TTTs é a diferença entre os níveis de fenóis totais e residuais (AMORIM et al., 2008). O TFTs foi calculado utilizando alíquotas de 0,2 mL dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico de *M. affinis*, *M. caiuia* e *M. pyrifolia* diluídos em metanol (1 mg/mL, p/v) e transferido para tubos de ensaio. Em seguida, foram adicionados 500 µL de solução aquosa do reagente Folin- Ciocalteu (10%, v/v), 1 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (7,5%, p/v) e 8,3 mL de água destilada. As amostras permaneceram em repouso no escuro durante 30 minutos a temperatura ambiente e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 760 nm contra um branco preparado com água destilada. As amostras foram submetidas ao mesmo procedimento que o TFTs. A curva de calibração foi obtida fazendo-se uso de oito diluições de ácido tânico (0,5 – 10 µg/mL). Para calcular o conteúdo fenólico residual, 6 mL dos extratos diluídos (1 mg/mL, p/v) foram colocados sob agitação durante 3 horas com 1 g de caseína e 12 mL de água destilada. Após filtrar, o volume foi ajustado a 25 mL com água destilada. Em seguida, 1 mL do filtrado foi adicionado a 500 µL de Folin-Ciocalteu, 1 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (7,5%, p/v) e 7,5 mL de água destilada. Os TFTs e TTTs foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido tânico por grama de extrato (mg EAT/g). As amostras foram avaliadas com seis repetições. As equações da curva de calibração para o ácido tânico foi $y = 0,0839x + 0,0134$ ($R^2 = 0,9902$) para as espécies de *M. affinis* e *M. caiuia* $y = 0,1812 + 0,0534$ ($R^2 = 0,9357$) para *M. pyrifolia*.

3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.6.1 Atividade sequestradora de radicais livres pelo método DPPH

Através da atividade antioxidante de um produto é possível avaliar se o mesmo tem a capacidade de sequestrar radicais livres, que são prejudiciais à saúde. Este teste utilizou uma solução contendo o radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil - DPPH para avaliar a habilidade dos extratos em sequestrar este radical livre estável, que potencialmente reage com compostos capazes de doar um átomo de hidrogênio. A redução do radical DPPH foi determinada pela mudança colorimétrica medida em 517 nm (RUFINO, et al., 2007; W. BRAND-WILLIAMS, et al., 1995). Para a realização do teste, adicionou-se 270 µL da solução de DPPH na concentração de 23,6 µg/mL a diferentes concentrações dos extratos de *M. affinis*; *M. caiuia* e *M. pyrifolia* (62,5 a 10.000 µg/mL) diluídos em MeOH. Após 30 minutos, a absorbância foi lida em espectrofotômetro com um comprimento de onda $\lambda = 517$ nm. O ácido ascórbico foi usado como composto de referência, com concentrações que variaram de 1,56 a 200 µg/mL. O controle negativo foi composto pela mistura DPPH e MeOH. A eliminação de radicais DPPH foi calculada pela fórmula: Cálculo da atividade sequestradora: $AS (\%) = 100 (\text{Abs. controle} - \text{Abs. Amostra} / \text{Abs. controle})$. A atividade antioxidante dos extratos foi expressa como IC_{50} , definida como a concentração do extrato (µg/mL) necessária para inibir a formação de 50% dos radicais livres por DPPH.

3.6.2 Atividade sequestradora de radicais livres pelo método ABTS

Para o ensaio do radical ABTS (2,2 AZINO BIS (3-etilbenzo-tiazolina-6-ácido sulfônico) sal de diamônio, foi utilizado o método descrito por ZHU et al. (2011) e RUFINO et al. (2007). As soluções utilizadas de ABTS 7 mM e solução de persulfato de potássio (K_2SO_3) 2,4 mM foram misturadas e mantidas ao abrigo da luz para reagir durante 12 h à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi diluída misturando 1 mL de solução de ABTS + com 65 mL de metanol para se obter uma absorbância de $0,70 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$ a 734 nm utilizando o espectrofotômetro (HAN et al., 2011). As concentrações da solução padrão de Trolox utilizadas neste teste foram de 0,5 a 5,0 µg/mL. A solução Trolox + MeOH foi o branco do experimento. Aliquotas de 2.700 µL do radical ABTS foram acrescentadas nas concentrações de 12,5 a 100 µg/mL dos extratos de *M. affinis*, *M. caiuia* e *M. pyrifolia*. Após reagir durante 6 min, a leitura das absorbâncias em triplicata, foi realizada no comprimento de $\lambda = 734$ nm utilizando o espectrofotômetro. A atividade antioxidante equivalente ao trolox foi determinada pelo percentual de sequestro + desvio padrão. Os resultados expressos em IC_{50} que foram definidos como a concentração de extrato (µg/mL) necessária para inibir a

formação de 50% de radical ABTS. A atividade de eliminação do radical foi calculada ABTS (%) = $100 \times (\text{média das absorbâncias do branco} - \text{média das absorbâncias da amostra}) / \text{média das absorbâncias do branco}$.

3.6.3 Atividade sequestradora de radicais livres pelo método do fosfomolibdênio

A técnica descrita por Pietro e colaboradores (1999) foi utilizada para avaliar a atividade antioxidante através da redução do complexo fosfomolibdênio. Este complexo, formado em meio aquoso, é composto por 0,498 g de fosfato de sódio monobásico, 0,494 g de molibdato de amônio e 60 mL da solução de ácido sulfúrico, ajustado para o volume final de 100 mL. Para este ensaio, as amostras extrativas de *M. affinis*, *M. cauiua* e *M. pyrifolia* foram diluídas em metanol obtendo-se a concentração de 1 mg/mL. Partindo desta concentração, alíquotas de 100 µL de cada extrato foram transferidas para *eppendorfs* contendo 1 mL do reagente fosfomolibdênio. O branco foi composto por 1 mL do reagente e 100 µL de MeOH. A curva padrão foi realizada com o ácido ascórbico nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL. Em seguida, todos os *eppendorfs* foram colocados em banho-maria a 95 °C por 90 minutos. Após o resfriamento das amostras, a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de $\lambda = 695$ nm. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados analisados e expressos em IC₅₀, que foram definidos como a concentração de extrato (µg/mL) necessária para inibir a formação de 50% de radical fosfomolibdênio.

3.7 LINHAGENS CELULARES E CULTIVO

As linhagens celulares utilizadas no teste de citotoxicidade foram HEp-2 (carcinoma de laringe humana), HT-29 (câncer de cólon), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), e NCI-H292 (carcinoma de pulmão), todas cultivadas em meio de cultura DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium. Para as linhagens em suspensão HL-60 (leucemia promielocítica aguda), K562 (leucemia mieloide crônica) e MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda), utilizou-se o meio de cultura RPMI- 1640. Ambos os meios de cultura, foram suplementados com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% e adicionados 100 µg/mL de penicilina e estreptomicina e todas as culturas ficaram mantidas em estufa atmosférica com 5% de CO₂. Todas as linhagens foram provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil e mantidas no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os eritrócitos humanos foram obtidos através de punção intravenosa a vácuo, de indivíduos voluntários saudáveis, em tubos heparinizados.

3.7.1 Atividade citotóxica frente a linhagens cancerígenas

A atividade citotóxica foi realizada através do método do MTT [brometo de (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio], que se baseia na capacidade da enzima succinato desidrogenase, presente no ciclo de Krebs e ativa nas mitocôndrias viáveis, de converter o sal tetrazólio, de cor amarela em cristais de formazan, de cor purpura (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983). As linhagens de células foram plaqueadas em placas de 96 poços nas concentrações $0,3 \times 10^5$ células/mL (HEp-2, HT-29, MCF-7 e NCI-H292), $0,3 \times 10^6$ células/mL (HL-60 e K562) ou 10^6 células/mL (MOLT-4) e incubadas. Após 24 horas, os extratos foram adicionados na concentração de 50 µg/mL e as frações na concentração de 25 µg/ mL. Após 72 horas de tratamento, foram adicionados a cada poço 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço. A doxorrubicina (5 µg/mL) foi utilizada como fármaco padrão. A absorbância foi medida em um leitor automático de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a porcentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism 7.0 Demo*. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras com atividade relevante (95 a 100 % de inibição), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 70 a 95 %) e sem atividade (inibição de crescimento menor que 70 %) (RODRIGUES et al., 2014). A concentração capaz de reduzir em 50 % a viabilidade das células em relação ao controle (CI_{50}) foi calculada para definição do grau de citotoxicidade, através de regressão não linear utilizando o software *Graph pad prisma* versão 7.0 demo.

3.8 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Através da atividade hemolítica foi possível avaliar se os produtos são capazes de promover danos à membrana dos eritrócitos, seja pela formação de poros ou por ruptura total. Os eritrócitos humanos foram lavados três vezes com solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM), e após a última centrifugação (3000 rpm, 5 min) o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em solução salina para se obter uma suspensão de eritrócitos a 2%. O experimento foi realizado em microplaca com 96 poços. Foram plaqueados: 100 µL de solução salina (controle negativo); 50 µL da solução salina + 50 µL do veículo (branco); 80 µL de solução salina + 20 µL de Triton X- 100 a 1% (controle positivo); 100 µL de solução salina + 100 µL dos extratos de *M. affinis*, *M. caiuia* e *M. pyrifolia* em DMSO a 10 % (teste).

Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foi plaqueada em todos os poços. Após incubação por 1 h sob agitação constante a 28 °C, a placa permaneceu em repouso por 10 minutos e em seguida foi centrifuga. Após a coleta sobrenadante, a leitura óptica foi realizada (560 nm) em leitor automático de microplacas. Os experimentos foram realizados obedecendo todas as exigências do Comitê de Ética de humanos. Para este ensaio, considera-se tóxico o produto que apresenta valor de concentração efetiva 50% (CE₅₀) < 200.

3.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA MICRORGANISMOS UTILIZADOS

As linhagens de bactérias e o fungo leveduriforme foram provenientes da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco-UFPEDA. Foram utilizadas inicialmente quatro bactérias Gram-positivas (G⁺): *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02); *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86); *Micrococcus luteus* (UFPEDA 100) e *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138); três bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (UFPEDA 224); *Serratia marcescens* (UFPEDA 352) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416); uma álcool-ácido-resistente (AAR): *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71) e a levedura *Candida albicans* (UFPEDA 1007). Também foram utilizados onze isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* oxacilina-resistentes (ORSA) (UFPEDA 671; UFPEDA 705; UFPEDA 709; UFPEDA 719; UFPEDA 725; UFPEDA 728; UFPEDA 729; UFPEDA 731 e UFPEDA 732); sete cepas de *S. aureus* Teste D+ (UFPEDA 670; UFPEDA 691; UFPEDA 700; UFPEDA 718; UFPEDA 719; UFPEDA 729 e UFPEDA 730) e três isolados de *S. aureus* sensível ou resistente a clindamicina (UFPEDA 672, UFPEDA 707 e UFPEDA 711).

3.9.1 Seleção antimicrobiana: Teste de difusão em disco de papel

A atividade antimicrobiana dos extratos avaliados pela metodologia de difusão em ágar, utilizando-se discos de papel de filtro com diâmetro de 6 mm, foi realizada conforme *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) para se conhecer o perfil de atividade dos extratos de *M. affinis*, *M. cauiua* e *M. pyrifolia*. Para este teste, alíquotas de 30 µL dos extratos na concentração de 30 mg/mL foi impregnados discos de papel. Os extratos foram solubilizados em DMSO e então esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm (TPP). Uma suspensão do microrganismo-teste (1,5 x 10⁸ UFC/mL para bactérias e 1,5 x 10⁵ UFC/mL para leveduras) foi determinada através de comparação visual com um padrão na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland e transferida 0,1 mL para placa de Petri de (15 x

90 mm) contendo o meio sólido AMH (Ágar Müller–Hinton). Posteriormente, os discos impregnados com os extratos foram adicionados sobre as placas inoculadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h (bactérias e leveduras). Após este período, o halo de inibição do crescimento microbiano foi medido em mm com o auxílio de um halômetro. Como controle positivo utilizou-se eritromicina para bactérias e nistatina para leveduras, todos os ensaios foram realizados em triplicata e os mesmos repetidos três vezes.

3.9.2 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Microbicida (CMM)

Após conhecer o perfil de inibição dos extratos, foi realizado o ensaio de susceptibilidade pela metodologia da microdiluição em caldo para determinação da Concentração Mínima inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida e fungicida (CMB e CMF) segundo o CLSI (2002; 2003). A determinação da concentração inibitória mínima foi feita utilizando placas com 96 poços.

Inicialmente, adicionou-se em cada poço 90 µL do meio Caldo Muller Hinton (CMH) e posteriormente, a partir da terceira coluna (A3), 90 µL dos extratos na concentração de 30 mg/mL. Esta alíquota foi homogeneizada e transferida para a quarta coluna (A4) e assim por diante até a décima segunda coluna (A12), que recebe os extratos na concentração de 0,03 mg/mL. Nesta última, a alíquota (90 µL) depois de homogeneizada foi descartada. Por último foi adicionada uma alíquota de 10 µL da suspensão do microrganismo preparada conforme o método anterior.

As microplacas com o meio, extrato e microrganismo foram incubadas por 24 horas (37 °C) para bactérias e leveduras. Posteriormente foram adicionados 30 µL de resazurina para análise quantitativa do crescimento microbiano nos poços e determinação da atividade antimicrobiana relativa de cada diluição das amostras. Para a determinação da Concentração Mínima Microbicida (CMM) foi repicada uma alíquota de 5 µL das concentrações que não apresentaram atividade visível a olho nu na microplaca do CMI, em placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton (AMH). Estas placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A CMM foi considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento celular sobre a superfície do AMH.

3.10 ESTUDO QUÍMICO

3.10.1 Métodos Cromatográficos: Coluna aberta com fase sílica gel

O isolamento dos compostos do extrato ativo foi feito por métodos cromatográficos. O extrato hexano de *Miconia cauiua* foi fracionado por cromatografia em coluna aberta com fase fixa sílica gel 60 G (70-230 mesh) e fase móvel hexano:acetato de etila:acetona: metanol em modo gradiente de polaridade crescente. Posteriormente as frações obtidas foram submetidas a CCD utilizando-se como fase móvel hexano (1:1 v/v); hexano:acetato de etila (8:2 v/v); hexano:acetato de etila (7:3 v/v) hexano:acetato de etila (6:4 v/v); hexano:acetato de etila (5:5 v/v); acetato de etila (1:1 v/v); acetona:metanol (8:2 v/v); acetona:metanol (5:5 v/v) e metanol (1:1 v/v). Além da cromatografia em coluna empregou-se no isolamento dos compostos, a recristalização das frações que se apresentaram semi-purificadas e o monitoramento por CCD.

3.10.2 Identificação estrutural

A análise estrutural dos compostos isolados foi realizada por métodos espectroscopia de ^1H - RMN e ^{13}C -RMN e espectrometria de massas. Os espectros de ^1H -RMN foram obtidos a 300 MHz e os de ^{13}C -RMN a 75 MHz em equipamento Varian Unity Plus-300. O TMS (tetrametilsilano) foi utilizado como padrão interno. As análises foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE.

3.10.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

A análise da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG- EM) foi realizada no Laboratório LAMAI do Departamento de Antibióticos em um cromatógrafo gasoso modelo CG-MSQP5050 A, marca Shimadzu, com fonte impacto de elétrons e analisador quadrupolo. As colunas utilizadas foram CarbolWAX e 5 % metil-fenil silicone. As condições de corrida foram: temperatura do forno 70 °C com um aumento de 4 °C/min até 280 °C, quando alcançada a temperatura a mesma foi mantida durante 15 min. O gás transportador foi hélio, com uma velocidade de fluxo constante de 1,4 mL/min. A temperatura da fonte de ionização foi mantida a 280 °C, a energia de ionização 70 eV e a corrente de ionização 0,7 kV. Os espectros de massa foram registados em 30-450 m/z. Os componentes individuais foram identificados pelo seu espectro de massa correspondentes a 70 eV.

3.10.4 Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetro e Ionização de massas

Os extratos de *M. caiuia* em acetato de etila e metanol foram analisados por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetro e Ionização de massas (LC-EI-MS/MS) com o intuito de identificar os compostos químicos presentes nestes extratos. Após a injeção de 5 µL das amostras, análise foi realizada por LC-EI-MS/MS Esquire 3000 Plus-Bruker Daltonics (Bruker Corp. EUA) com coluna Allatima C 18 (5 µm, 150 × 3.2 mm) e fase móvel composta por Formiato de Amônio (5 mmol L⁻¹) e metanol. O LC-EI-MS/MS foi obtido em modo íon positivo e negativo utilizando asseguintes condições: capilar 4000V, nebulizador 27 psi, 7 L/min de gás seco e 320 RC tempo seco (FERREIRA et al., 2014). O experimento foi realizado no Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica da UFRPE.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS MATERIAIS BOTÂNICOS

As espécies de *Miconia affinis*, *Miconia caiuia* e *Miconia pyrifolia* foram coletadas na Reserva Particular do Patrimônio Nacional (RPPN) Osvaldo Timóteo, e após a identificação pelo botânico MSc. Earl Celestino de Oliveira Chagas, as exsicatas foram depositadas no IMA-MAC sob os seguintes números de protocolos: *Miconia affinis* (MAC-14271); *Miconia caiuia* (MAC- 9815); e *Miconia pyrifolia* (MAC 58162).

4.2 EXTRATOS VEGETAIS

As partes aéreas de *M. affinis*, *M. caiuia* e *M. pyrifolia* foram submetidas ao método de extração por maceração exaustiva, e apresentaram rendimentos que variaram entre 1% e 5,4% conforme a Tabela 1. O rendimento obtido foi calculado através da relação entre o peso do extrato e o peso seco dos materiais vegetais utilizados no início da extração.

Tabela 1: Rendimento dos extratos brutos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) das espécies de *Miconia* estudadas.

Espécie vegetal /extrato	Hex (%)	AcEOt (%)	MeOH (%)
<i>M. affinis</i>	1,0	1,3	2,1
<i>M. caiuia</i>	1,3	1,8	5,4
<i>M. pyrifolia</i>	1,5	1,5	3,3

O método de extração por maceração tem sido utilizado com frequência por outros pesquisadores para obter os extratos apolares e polares de diferentes espécies de *Miconia*. O rendimento dos extratos varia conforme a polaridade dos solventes extraídos. No nosso estudo, o extrato mais polar, o metanólico, rendeu (%) até cinco vezes se comparado com o extrato em hexano. Este comportamento também foi observado em outros trabalhos, segundo Rodrigues (2007) e extração por maceração exaustiva em metanol das espécies *M. cabucu* e *M. ribiginosa* apresentaram rendimento 3,43% e 7,86% em relação a quantidade em gramas de material seco inicialmente utilizado.

O rendimento dos extrativos de *Miconia* em hexano e acetato de etila disponíveis na literatura condizem com os encontrados neste trabalho para *M. affinis*, *M. ciauia* e *M. pyrifolia*. Cunha et al. (2003a) obteve 0,8% de rendimento em massa do extrato hexânico trabalhando com a espécie *M. ligustroides*, enquanto que Barroso (2015) ao preparar o extrativo em acetato de etila da espécie *M. ferruginata*, obteve um rendimento de 1,6%, similares ao encontrado no presente estudo onde os rendimentos ficaram entre 1,3% e 1,8%.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

Com a caracterização fitoquímica dos extratos de *Miconia* em estudo foi possível detectar a presença majoritária de triterpenos e esteroides nos extratos em hexano de todas as espécies. Nos extratos em acetato de etila de *M. affinis* e *M. ciauia* observou-se a presença de flavonoides. Também foi possível verificar que a espécie *M. affinis* destaca-se por apresentar outras classes de metabólitos secundários, como as antroquinonas nos extratos hexano, Acetato de etila e metanol, e cumarinas no extrato metanólico (Tabela 2).

A presença de triterpenos também foi verificada em extratos brutos de outras espécies de *Miconia*, como *M. stenostachya*, *M. ligustroides* e *M. sellowiana* por Cunha et al. (2003, 2006) com o isolamento de três triterpenos para cada espécie.

Em estudos fitoquímicos realizados com o extrato metanólico de *Miconia prasina* verificou-se a presença de diversos flavonoides, uma classe de constituintes químicos que possui diversas atividades biológicas relatadas na literatura, como ação antidiabética, nas doenças renais e câncer (LOPES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007; TARAWNEH, 2014). Araujo (2011) também observou a presença de flavonoides no extrato em MeOH de *M. minutiflora*, além da presença de alcaloides, terpenos e esteroides.

Tabela 2: Caracterização fitoquímica dos extratos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de *Miconia affinis*, *Miconia caiuia* e *Miconia pyrifolia* por cromatografia em camada delgada (CCD).

Extratos	Reveladores							
	Liebermann– Burchard	Anisaldeído	Sulfato sérico	KOH EtOH	NEU	AlCl ₃	Dragendorff	FeCl ₃
<i>M. affinis</i> Hex	Triterpenos/ esteroides	Triterpenos/ esteroides	Solvente universal	Antraquinonas e antracenos				
<i>M. affinis</i> AcOEt		-	Flavonoides	Antraquinonas e antracenos	-	-	-	Taninos
<i>M. affinis</i> MeOH		Flavonoides e Terpenos		Cumarinas e antraquinonas	Flavonoides	Flavonoides		
<i>M. caiuia</i> Hex	Triterpenos/ esteroides	Triterpenos/ esteroides	Solvente universal	-				Taninos
<i>M. caiuia</i> AcEOt		-	Flavonoides		-	-	-	Taninos
<i>M. caiuia</i> MeOH		Flavonoides/ terpenos		-	Flavonoides	Flavonoides		
<i>M. pyrifolia</i> Hex	Triterpenos/ esteroides	Triterpenos/ esteroides	Solvente universal	-				
<i>M. pyrifolia</i> AcEOt		-	-	-	-	-	-	Taninos
<i>M. pyrifolia</i> MeOH		Flavonoides e Terpenos			Flavonoides	Flavonoides		

KOH EtOH- hidróxido de potássio em 5% de etanol; NEU- ácido etilborilaminoéster a 1% em etanol; AlCl₃ – Cloreto de Alumínio; FeCl₃ – Cloreto férrico; (-) Não detectado

4.4 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS (TFTS) E TEOR DE TANINOS TOTAIS (TTTS)

A análise quantitativa do TFTs e TTTs em miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de extrato (mg EAT/g) dos extratos orgânicos de *Miconia* variaram muito entre si. Os extratos em acetato de etila de *M. affinis* e *M. caiuia* destacaram-se por apresentar os maiores valores de TFTs ($154,84 \pm 15,9$ e $133,45 \pm 9,7$) e TTTs ($99,3 \pm 9,5$ e $85,11 \pm 11,0$), respectivamente. Para os extratos hex e AcOEt de *M. pyrifolia* não possível quantificar os valores de fenóis totais e taninos totais pelo método do Folin- Ciocalteu, devido a interação entre as moléculas químicas presentes no extrato e o carbonato de sódio (Na_2CO_3) utilizado para o experimento. Os resultados obtidos no doseamento de fenóis totais e taninos totais estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3: Doseamento de fenóis totais e taninos totais dos extratos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de *Miconia affinis*, *Miconia caiuia* e *Miconia pyrifolia* pelo método Folin- Ciocalteu.

Extratos	Fenóis Totais (mg EAT/g $\pm$ SD)	Taninos Totais (mg EAT/g $\pm$ SD)
<i>M. affinis</i> Hex	$59,1 \pm 5,5$	$21,1 \pm 2,3$
<i>M. affinis</i> AcOEt	$154,8 \pm 15,9$	$99, \pm 9,5$
<i>M. affinis</i> MeOH	$146,6 \pm 12,5$	$70,7 \pm 7,4$
<i>M. caiuia</i> Hex	$92,2 \pm 4,2$	$75,9 \pm 4,9$
<i>M. caiuia</i> AcOEt	$133,4 \pm 9,7$	$85,1 \pm 11,0$
<i>M. caiuia</i> MeOH	$80,5 \pm 3,9$	$31,8 \pm 7,1$
<i>M. pyrifolia</i> Hex	ND	ND
<i>M. pyrifolia</i> AcOEt	ND	ND
<i>M. pyrifolia</i> MeOH	$35,1 \pm 2,7$	$1,6 \pm 0,3$

ND: não- determinado; mg EAT/g – miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de extrato

Li et al. (2001) estudando os compostos fenólicos da espécie *M. myriantha* isolaram e elucidaram os fenóis matucinol-7-O-[4",6"-O-(S)-hexaidroxifenol]-D-glicopiranosídeo e matucinol-7-O-[4",6"-di-O-galoil]-D-glicopiranosídeo atribuindo a estes, as atividades

inibitórias contra as enzimas aspárticas que quebram as ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas secretadas pela *Candida albicans*. Derivados de ácidos fenólicos e tânico também foram encontrados nas espécies *M. cabucu* e *M. rubiginosa* (Rodrigues, 2008).

Conhecidos por apresentar propriedades farmacológicas como analgésicas e anti-inflamatórias, os taninos também são identificados e isolados em diversos extratos de plantas (JORGE, et al., 2004). Nas espécies da Família Melastomataceae, os derivados de taninos hidrossolúveis são frequentemente encontrados (HAVSTEEN, 2002), justificando o aparecimento destes, durante a análise do perfil fitoquímico e os altos valores de taninos totais obtidos das espécies *M. affinis* e *M. caiuia*.

Os compostos fenólicos também são muito conhecidos por apresentar a capacidade em sequestrar os radicais livres, esse potencial antioxidante é atribuído ao grupo das hidroxilas que podem ceder os elétrons e resistir ao deslocamento deste em torno do sistema aromático. Essas substâncias ainda podem agir como agente pró-oxidativos, exercer efeito antitumorigênico e promover a atividade antitumoral (OLIVEIRA, 2007).

4.5 ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES PELO MÉTODO DPPH, ABTS E FOSFOMOLIBDÊNIO

A atividade sequestradora de radicais livres dos extratos de *M. affinis*, *M. caiuia* e *M. pyrifolia* avaliada pelos métodos DPPH, ABTS e fosfomolibdênio, estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Atividade antioxidante dos extratos de *M. affinis*, *M. caiuia* e *M. pyrifolia*.

Amostras	DPPH CI ₅₀ (µg/mL)±DP	ABTS CI ₅₀ (µg/mL)±DP	Fosfomolibdênio (mg/EAC g)
<i>M. affinis</i> Hex	> 500	2,55 ± 0,01	63, 45 ± 5,5
<i>M. affinis</i> AcOEt	> 500	3,50 ± 0,07	94,84 ± 8,34
<i>M. affinis</i> MeOH	71,54 ± 5,8	7,87 ± 0,06	146,67 ± 12,5
<i>M. caiuia</i> Hex	74,32 ± 0,5	0,90 ± 0,07	100,2 ± 4,25
<i>M. caiuia</i> AcOEt	2,44 ± 0,02	1,46 ± 0,13	125,45 ± 9,4
<i>M. caiuia</i> MeOH	5,60 ± 0,07	0,87 ± 0,12	80,55 ± 3,92

<i>M. pyrifolia</i> Hex	> 500	1,08 ± 0,10	24,42 ± 0,20
<i>M. pyrifolia</i> AcOEt	10,70 ± 0,05	2,32 ± 0,10	28,87 ± 0,15
<i>M. pyrifolia</i> MeOH	4,32 ± 0,04	4,73 ± 0,42	37,40 ± 0,23

CI₅₀ – Concentração que inibe 50% a formação dos radicais ± Desvio padrão; mg/EAC g-miligramas equivalentes de ácido ascórbico por grama do extrato.

Os extratos de *Miconia* avaliados nas metodologias DPPH e ABTS apresentam efeitos de inibição dose-dependente. Quanto menor for os valores de CI₅₀, maior é o potencial antioxidante das amostras. Diante disto, infere-se que os extratos em AcEOt e MeOH de *M. caiuia* e o extrato metanólico de *M. pyrifolia* apresentaram alta capacidade de sequestro do radical DPPH, com valores de CI₅₀ que variaram entre 2,44 µg/mL – 5,60 µg/mL. Pieroni et al. (2011) investigaram a atividade antioxidante de *M. albicans* através do método do DPPH e verificaram que o extrato em MeOH destacou-se por apresentar a maior quantidade de compostos fenólicos e consequentemente a melhor atividade antioxidante. Na metodologia por ABTS todos os extrativos foram considerados com propriedades antioxidantes. Mancini et al. (2008) também avaliaram a atividade antioxidante pelo método do ABTS dos flavonoides isolados de *M. alypifolia*, e verificou que aqueles flavonoides apresentavam percentual de inibição em até 100 % do radical ABTS em concentrações inferiores a 100 µM.

Na atividade antirradicalar pelo método do fosfomolibdênio os extratos de *M. affinis* e *M. caiuia* foram os que se mostraram mais expressivos, com os maiores valores de miligramas equivalentes de ácido ascórbico por gramas do extrato.

De acordo com o perfil fitoquímico, é possível verificar a presença de flavonoides nos extratos em acetato de etila e metanol das espécies estudadas. Essa classe de compostos possui uma variedade de atividades farmacológicas e dentre estas, antioxidante (GATTUSSO et al., 2007), sugerindo que a alta atividade radicalar dos extratos podem está associada a estes metabólicos secundários.

4.6 CITOTOXICIDADE

4.6.1 Citotoxicidade em células cancerígenas

Os resultados obtidos para a espécie de *M. affinis* mostraram que os extratos em hexano, acetato de etila e metanol inibiram o crescimento das linhagens de leucemia (HL-60, MOLT-4 e K-562) em 91% - 100%. Além disso, o extrato em AcOEt apresentou percentual

de inibição do crescimento celular da linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama (MCF-7) de 100%. Nenhum extrato de *M. affinis* inibiu o crescimento da linhagem NCI-H292 acima de 70% (Tabela 5).

Os extratos em hexano e acetato de etila de *M. caiuia* apresentaram atividade relevante, pois conseguiram inibir em 100% o crescimento das linhagens de leucemia promielocítica aguda (HL-60) e leucemia mieloide crônica (K-562) e atividade moderada para a linhagem HEP-2 (carcinoma de laringe humana). O extrato metanólico com atividade moderada, apresentou percentual de inibição de 96,79 % frente a linhagem HT-29 (câncer de cólon) e 96,42 % frente a linhagem MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda).

Os extrativos de *M. pyrifolia* mostrou-se com perfil relevante frente à linhagem MOLT-4, com os valores de 100 % de inibição do crescimento celular, porém não foi ativo frente as linhagens HEP-2, MCF-7 e NCI-H292. Foi observada atividade moderada dos extratos em hexano, acetato de etila e metanol frente à linhagem K-562.

A análise comparativa entre os percentuais de inibição de crescimento das linhagens de leucemia, tratadas com os extratos orgânicos das espécies de *M. affinis*, *M. caiuia* e *M. pyrifolia* na concentração de 50 µg/mL, classifica os extratos da seguinte forma: atividade relevante para a linhagem de leucemia linfoblástica aguda (MOLT-4), atividade relevante à moderada em relação a linhagem leucemia mieloide crônica (K-562) e atividade relevante à moderada frente a linhagem leucemia promielocítica aguda (HL-60), com exceção do extrato metanólico de *M. pyrifolia*, classificado como não ativo para esta linhagem (Tabela 6).

Na literatura foram encontrados estudos a cerca da atividade antitumoral apresentada por triterpenos isolados de plantas do gênero *Miconia* (DALLA VECHIA et al., 2009), podendo-se inferir que a ação antitumoral apresentada pelos extratos pode está relacionada com a presença de triterpenos, conforme foram observados durante a prospecção fitoquímica no presente estudo.

Estudos realizados por Oliveira (2010) com triterpenos isolados de *M. ferruginata* mostraram-se satisfatórios com percentuais de inibição de 98,1% e 98,5% para as linhagens de melanoma e cólon, respectivamente.

Adicionalmente, Serpeloni (2011) avaliou a atividade das espécies *M. albicans* e *M. stenostachya* e verificou diferenças na citotoxicidade, a espécie *M. albicans* apresentou citotoxicidade em concentração de 30 mg/mL diferente da espécie *M. stenostachya*, que se mostrou citotóxica em concentração duas vezes maior (60 mg/mL) durante os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade.

Tabela 5: Percentual de Inibição do crescimento celular (IC %) dos extratos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de *Miconia affinis*, *Miconia caiuia* e *Miconia pyrifolia* em linhagens de células tumorais na concentração de 50 µg/mL através do método colorimétrico MTT após 72 horas de tratamento.

Extratos	HEp-2	HT-29	MCF-7	NCI-H292	HL-60	K-562	MOLT-4
<i>M. affinis</i> Hex	60,38 ± 2,75	88,66 ± 2,17	64,80 ± 5,29	39,29 ± 2,26	91,22 ± 5,77	98,44 ± 0,82	100,00 ± 0,0
<i>M. affinis</i> AcOEt	83,88 ± 0,91	53,96 ± 3,36	100,00 ± 0,0	41,50 ± 3,03	100,00 ± 0,0	98,81 ± 0,71	100,00 ± 0,0
<i>M. affinis</i> MeOH	40,65 ± 2,20	96,23 ± 0,21	56,65 ± 4,81	59,55 ± 0,35	100,00 ± 0,0	99,11 ± 0,91	100,00 ± 0,0
<i>M. caiuia</i> Hex	82,92 ± 4,20	82,92 ± 4,20	68,27 ± 4,50	98,86 ± 0,22	100,00 ± 0,0	100,00 ± 0,0	95,06 ± 0,0
<i>M. caiuia</i> AcOEt	93,51 ± 0,16	53,96 ± 3,97	79,41 ± 1,59	82,83 ± 0,91	100,00 ± 0,0	100,00 ± 0,0	96,72 ± 0,0
<i>M. caiuia</i> MeOH	48,52 ± 6,70	96,79 ± 0,32	63,08 ± 1,51	46,80 ± 1,42	79,04 ± 1,01	100,00 ± 0,0	96,42 ± 0,0
<i>M. pyrifolia</i> Hex	59,63 ± 2,55	31,40 ± 0,27	69,26 ± 2,12	31,01 ± 3,18	78,78 ± 4,01	94,03 ± 0,56	100,00 ± 0,0
<i>M. pyrifolia</i> AcOEt	49,96 ± 1,41	94,10 ± 0,48	73,79 ± 2,98	61,23 ± 1,25	100,00 ± 0,0	89,01 ± 0,12	100,00 ± 0,0
<i>M. pyrifolia</i> MeOH	21,82 ± 1,28	52,22 ± 3,92	66,14 ± 1,27	58,23 ± 0,80	27,54 ± 4,90	90,89 ± 2,0	100,00 ± 0,0

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão do percentual de inibição do crescimento celular das células: HEp-2 (carcinoma de laringe humana); HT-29 (câncer de cólon); MCF-7 (adenocarcinoma de mama); NCI-H292 (carcinoma de pulmão); HL-60 (leucemia promielocítica aguda); K562 (leucemia mieloide crônica) e MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda) tratadas com os extratos orgânicos de *Miconia* em relação ao controle.

Após avaliação criteriosa do perfil citotóxico dos extratos orgânicos de *M. affinis*, *M. caiuia* e *M. pyrifolia* frente às células cancerígenas, os extratos que apresentaram perfil relevante a moderado com percentual de inibição do crescimento acima de 70 %, foram testados em várias concentrações para calcular a concentração do extrato que inibe 50% do crescimento das células tumorais comparados com o controle (Tabela 7).

Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/mL}$ com seus respectivos intervalos de confiança. A análise entre as espécies para esta linhagem mostra que o extrato em hexano de *M. caiuia* apresentou a melhor atividade com a capacidade de inibir na concentração abaixo de 10 $\mu\text{g/mL}$ o crescimento em 50% das células de leucemia promielocita aguda.

Os extratos de *M. caiuia* testados com a linhagem MOLT-4 mostraram-se ativos com valores de CI_{50} de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato metanólico; CI_{50} de 2,2 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato em acetato de etila; e CI_{50} de 1,4 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato em hexano. O único extrato de *M. affinis* testado para a linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7), apresentou valor de CI_{50} de 16,33 $\mu\text{g/mL}$, valor este, que caracterizou o extrato como ativo segundo os valores estabelecidos pelo Instituto do Câncer dos Estados Unidos, que considera o extrato ativo com valores de CI_{50} abaixo de 30 $\mu\text{g/mL}$. Nenhum dos extratos testados para as linhagens HEP-2 e NCI-H292 apresentaram valores de CI_{50} abaixo de 30 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 6: CI_{50} dos extratos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de *Miconia affinis*, *Miconia caiuia* e *Miconia pyrifolia* e doxorrubicina (controle positivo) em células neoplásicas, através do ensaio colorimétrico MTT, após 72 horas de tratamento.

Extratos	CI_{50} (mg/ mL)						
	Intervalo de confiança (IC 95%)						
	HEp-2	HT-29	MCF-7	NCI-H292	HL-60	K-562	MOLT-4
<i>M. affinis</i> Hex	NT	-	NT	NT	11,38 (8,28 - 15,64)	5,55 (5,0- 6,0)	-
<i>M. affinis</i> AcOEt	32,44 (28,15 -37,39)	NT	16,33 (13,23 -20,17)	NT	13,61 (11,7 - 15,72)	-	-
<i>M. affinis</i> MeOH	NT	-	NT	NT	25,36 (21,34 - 26,78)	-	-
<i>M. caiuia</i> Hex	25,58 (22,12 - 37,39)	-	NT	42,95 (33,90 - 54,42)	9,45 (8,61 - 10,39)	17,26 (14,20 - 20,99)	3,49 (2,61 - 4,66)
<i>M. caiuia</i> AcEOt	35,14 (32,90 - 61,77)	NT	38,53 (33,26 - 44,12)	34,43 (26,45 - 44,67)	25,59 (21,24 - 30,84)	14,79 (12,93 - 16,91)	2,02 (0,65 - 6,26)
<i>M. caiuia</i> MeOH	NT	-	NT	NT	36,74 (31,64 - 42,64)	46,47 (42,24 - 51,12)	1,50 (0,26 - 8,51)
<i>M. pyrifolia</i> Hex	NT	NT	NT	NT	21,30 (13,26 - 34,22)	-	8,0 (6,49 - 10,09)
<i>M. pyrifolia</i> AcEOt	NT	-	NT	NT	24,43 (19,86 - 31,55)	-	19,91 (14,59 - 27,16)
<i>M. pyrifolia</i> MeOH	NT	NT	NT	NT	25,12 (20,00 - 31,53)	-	-
Doxorrubicina	0,7 (0,3 - 1,4)	0,4 (0,3 - 0,5)	0,11 (0,08 - 0,15)	0,01 (0,004 - 0,3)	0,06 (0,05 - 0,08)	0,8 (0,7- 0,9)	0,04 (0,04 - 0,05)

Os valores apresentados são da concentração que inibe 50% do crescimento celular das células: HEp-2 (carcinoma de laringe humana); HT-29 (câncer de cólon); MCF-7 (adenocarcinoma de mama); NCI-H292 (carcinoma de pulmão); HL-60 (leucemia promielocítica aguda); K562 (leucemia mieloide crônica); MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda) tratadas com os extratos de *Miconia* e Doxorrubicina em relação ao controle, calculados por análise de regressão não-linear. NT- não testado, (-): não-ativo.

4.7 ANÁLISE DA RUPTURA DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA

Com relação à atividade hemolítica, os extratos hexano, acetato de etila e metanol de *M. affinis*, *M. caiuia* e *M. pyrifolia* apresentaram CE_{50} acima de 200 $\mu\text{g/mL}$, portanto, não foram considerados hemolíticos. Estes resultados indicam que os extratos em estudo não foram capazes de promover a hemólise celular, não sendo considerado tóxico para eritrócitos humanos. Neste ensaio, considera-se tóxico o produto que apresenta valor de concentração efetiva 50% (CE_{50}) < 200 $\mu\text{g/mL}$ (COSTA-LOTUFO et al., 2005).

4.8 ANTIMICROBIANA

4.8.1 Teste por Difusão em Disco de papel

Os resultados obtidos no teste de sensibilidade antimicrobiana foram expressos em milímetros (mm) através da medição dos halos de inibição microbiana. Com uma análise geral dos resultados obtidos na Tabela 7 pode-se afirmar que todos os extratos de *M. affinis* e *M. caiuia* apresentaram atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas.

O extrato em hexano de *M. pyrifolia* foi ativo apenas para a levedura *Candida albicans* apresentando halo de inibição de 22 mm. Os extratos de *M. affinis* mostraram-se ativos frente a todas as classes de microrganismos utilizados: bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, 1 Álcool-ácido- resistente- AAR e leveduriforme, com halos de inibição de crescimento em 18 mm para *Micrococcus luteus* tratados com o extrato AcOEt; 20 mm para *C. albicans* com tratamento dos extratos Hex e AcOEt; e halos 16 mm inibindo o crescimento de *E. coli* tratada com o extrato Hex. O extrato em MeOH de *M. affinis* inibiu o crescimento bacteriano de *B. subtilis* com média de halo de inibição de 21 mm.

Durante a análise comparativa dos extratos de *M. caiuia* observou-se que apenas o extrato metanólico mostrou-se ativo frente à bactéria *Escherichia coli*. O perfil de sensibilidade dos extratos em Hex e AcEOt de *M. caiuia* para as bactérias *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis* e *E. faecalis* são bastante semelhantes quando comparados entre si, comprovando o potencial antimicrobiano desta espécie para bactérias Gram-positivas.

O extrato Hex de *M. pyrifolia* não apresentou atividade antimicrobiana, entretanto sugere-se que a ausência da atividade pode estar relacionada com a polaridade do extrato, visto que o meio utilizado- Mueller-Hinton (MH) é polar e o extrato apolar, ocorrendo uma má difusão do extrato no meio, dificultando a ação do mesmo para inibir o crescimento microbiano.

A atividade antimicrobiana das espécies *M. albicans*, *M. rubiginosa* e *M. stenostachya* também foi avaliada pelo método de difusão, demonstrando a inibição do crescimento microbiano em concentrações muito superiores das utilizadas no referido trabalho (30 mg/mL). Nas concentrações de 300 mg/mL, as espécies *M. albicans* e *M. rubiginosa* tiveram halos de inibição que variaram entre 11 a 19 mm para bactérias Gram-positivas, e halos de inibição em torno de 20 mm para *C. albicans* (CELOTTO et al, 2003).

Após conhecer o perfil de inibição dos extratos em estudo, todos os extratos foram submetidos ao ensaio de microdiluição em caldo para determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a Concentração Mínima Microbicida (CMM).

Tabela 7: Média do perfil de Sensibilidade Antimicrobiana dos extratos em hexano (HEX), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) em milímetros (mm) de *Miconia affinis*, *Miconia caiuia* e *Miconia pyrifolia* com concentração de 30 mg/ mL.

MICRORGANISMOS UFPEDA									
Extratos	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. marcencens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>C. albicans</i>
<i>M. affinis</i> Hex	-	10,00 ± 0,0	15,0 ± 1,0	10,0 ± 0,0	16,3 ± 0,5	10,0 ± 0,0	-	-	20,0 ± 0,0
<i>M. affinis</i> AcOEt	15,0 ± 0,0	16,0 ± 1,7	18,33 ± 0,5	15,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0	13,3 ± 1,5	10,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0	20,0 ± 0,0
<i>M. affinis</i> MeOH	10,00 ± 0,0	21,33 ± 0,5	13,66 ± 0,5	16,6 ± 0,5	10,0 ± 0,0	11,0 ± 1,0	-	-	13,6 ± 0,5
<i>M. caiuia</i> Hex	18,33 ± 0,5	19,33 ± 0,5	19,7 ± 0,5	19,3 ± 0,5	-	13,0 ± 1,0	-	15,0 ± 0,0	16,0 ± 0,0
<i>M. caiuia</i> AcEOt	16,33 ± 1,1	17,0 ± 1,0	16,0 ± 1,7	16,0 ± 0,0	-	10,0 ± 0,0	-	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0
<i>M. caiuia</i> MeOH	10,66 ± 0,5	10,0 ± 0,0	14,66 ± 0,5	16,0 ± 0,0	18,0 ± 0,0	-	-	10,0 ± 0,0	14,0 ± 0,0
<i>M. pyrifolia</i> Hex	-	-	-	-	-	-	-	-	22,0 ± 0,0
<i>M. pyrifolia</i> AcEOt	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. pyrifolia</i> MeOH	10,33 ± 0,5	10,33 ± 0,5	10,00 ± 0,0	-	11,7 ± 1,5	-	-	-	-
Clorafenicol/ Nistatina	33,0 ± 0,0	26,0 ± 0,0	45,0 ± 0,0	20,0 ± 0,0	35,0 ± 0,0	19,0 ± 0,0	20,0 ± 0,0	17,0 ± 0,0	NT

Bactérias G(+): *S. aureus* = *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02); *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86); *Micrococcus luteus* (UFPEDA 100) e *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138); Bactérias Gram-negativas (G-): *Escherichia coli* (UFPEDA 224); *Serratia marcencens* (UFPEDA 352) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416); Álcool-ácido-resistente (AAR): *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71) e a levedura *Candida albicans* (UFPEDA 1007), NT: não testado; (-): não ativo.

4.8.2 Concentração Mínima Inibitória- CMI e Concentração Mínima Microbicida- CMM

A Tabela 8 abaixo mostra a atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos de *Miconia* para todos os microrganismos utilizados neste ensaio.

Tabela 8: Atividade bacteriostática e bactericida dos extratos brutos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de *Miconia affinis*, *M. caiuia* e *M. pyrifolia* com concentração inicial de 30 mg/mL.

MICRORGANISMOS UFPEDA									
Extratos	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. marcencens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>C. albicans</i>
	CMI/ CMM	CMI/ CMM	CMI/ CMM	CMI/ CMM	CMI/ CMM	CMI/ CMM	CMI/ CMM	CMI/ CMM	CMI/ CMM
<i>M. affinis</i> Hex	7,5 / 15,0	3,75 / 7,5	0,94 / 7,5	0,23 / 1,87	3,75 / 7,5	3,75 / 7,5	3,75 / 7,5	1,87 / 3,75	0,47 / 1,87
<i>M. affinis</i> AcOEt	7,5 / 15,0	0,23 / 1,87	0,94 / 1,87	0,93 / 3,75	0,93 / 7,5	3,75 / 15,0	3,75 / 7,5	3,75 / 7,5	0,93 / 3,75
<i>M. affinis</i> MeOH	3,75 / 7,5	3,75 / 3,75	1,87 / 3,75	1,87 / 7,5	1,87 / 7,5	3,75 / 3,75	3,75 / 7,5	1,87 / 7,5	1,87 / 7,5
<i>M. caiuia</i> Hex	0,05 / 0,47	0,05 / 0,23	0,47 / 7,5	0,23 / 1,87	3,75 / 3,75	3,75 / 3,75	-	0,47 / 0,47	0,05 / 0,94
<i>M. caiuia</i> AcEOt	0,11 / 0,94	0,23 / 0,94	0,94 / 15,0	0,94 / 7,5	3,75 / 3,75	3,75 / 15,0	-	0,94 / 3,75	0,12 / 0,94
<i>M. caiuia</i> MeOH	1,87 / 7,5	0,11 / 0,94	1,87 / 15,0	1,87 / 7,5	3,75 / 15,0	3,75 / 15,0	-	1,87 / 3,75	0,05 / 3,75
<i>M. pyrifolia</i> Hex	3,75 / 15,0	3,75 / 15,0	3,75 / 3,75	3,75 / 3,75	3,75 / 15,0	3,75 / 15,0	3,75 / 15,0	-	0,93 / 3,75
<i>M. pyrifolia</i> AcEOt	7,5 / 15,0	3,75 / 15,0	3,75 / 3,75	3,75 / 3,75	3,75 / 15,0	1,87 / 7,5	1,87 / 7,5	-	0,93 / 3,75
<i>M. pyrifolia</i> MeOH	7,5 / 15,0	3,75 / 15,0	3,75 / 15,0	7,5 / 7,5	7,5 / 15,0	1,87 / 7,5	3,75 / 15,0	-	-
Eritromicina/ Nistatina	0,6 / 1,2	1,2 / 2,4	0,6 / 1,2	0,3 / 0,3	1,2 / 2,4	0,6 / 1,2	-	0,25 / 0,25	NT

Bactérias G(+): *S. aureus* = *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02); *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86); *Micrococcus luteus* (UFPEDA 100) e *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138); Bactérias Gram-negativas (G-): *Escherichia coli* (UFPEDA 224); *Serratia marcencens* (UFPEDA 352) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416); Álcool-ácido-resistente (AAR): *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71) e a levedura *Candida albicans* (UFPEDA 1007), NT- não testado; (-): não-ativo.

Os resultados obtidos no teste de microdiluição demonstraram que os extratos Hex e AcEOt de *M. affinis* apresentaram valores de CMI de 0,23 mg/mL e 0,93 mg/mL para *E. faecalis*, e 0,47 mg/mL e 0,93 mg/mL para *C. albicans*, respectivamente. Ambos os extratos inibiram o crescimento de *M. luteus* na concentração de 0,94 mg/mL.

Os valores de CMI dos extratos mais apolares de *M. caiuia* variaram entre 0,05 e 0,94 mg/mL para bactérias gram-positivas. Enquanto o extrato em MeOH de *M. caiuia* apresentou CMI igual a 0,5 mg/mL para *C. albicans* e 0,1 mg/mL para *B. subtilis*. O extrato Hex apresentou valores de CMI e CMM de 0,47 mg/mL para *M. smegmatis* e de 0,5 e 0,47 mg/mL para *S. aureus*.

O extrato em hexano e acetato de etila de *M. pyrifolia* mostrou-se ativo com valores de CMI de 0,93 mg/mL para *C. albicans*. Os extratos orgânicos de *M. caiuia* e *M. pyrifolia* não tem atividade antimicrobiana para *P. aeruginosa* e *M. smegmatis*, respectivamente.

A ausência de resultados durante o teste de difusão para o extrato em AcOEt de *M. pyrifolia* pode estar relacionada com as limitações do teste com extratos de determinada polaridade. Estudos antimicrobianos realizados com *Miconia latecrenata* frente a *S. aureus* verificaram que os valores da CMI estavam abaixo de 20 mg/mL (GONTIJO et al., 2013). Adicionalmente, foi verificado que os valores de CMI para *M. rubiginosa* e *M. cabucu* variaram de 1,5 a maiores que 10 mg/mL (RODRIGUES, 2007), demonstrando que os resultados do nosso estudo quando comparados com outras espécies do gênero *Miconia* foram bastante promissores contra bactérias gram-positivas, com os valores da CMI abaixo de 1 mg/mL para os extratos em Hex, AcOEt e MeOH entre as espécies estudadas; contra bactérias gram-negativas os extratos em AcOEt com CMI igual a 0,93 mg/mL (*M. affinis*) e 1,87 mg/mL (*M. pyrifolia*), e para a levedura com CMI abaixo de 1 mg/mL, exceto o extrato MeOH de *M. affinis*.

Araújo (2011) analisou a atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *M. minutiflora* e obteve os valores de CMI para cepas de *S. aureus* de 0,625 mg/mL, corroborando com o valor obtido no presente estudo, onde obtivemos CMI de 0,05 mg/mL com o extrato em hexano de *M. caiuia*. Araújo (2011) também realizou a análise fitoquímica do extrato de *M. minutiflora*, verificando a presença de alcaloides, flavonoides, terpenos e triterpenos, o que justifica em nosso estudo a elevada atividade antimicrobiana dos extratos estudados. Rios e Receio (2005) afirmaram que em concentrações inferiores a 100 µg/mL, o extrato pode ser favorável em estudos a cerca do seu potencial antimicrobiano.

Diante disto, pode-se concluir que os extratos em estudo de *Miconia* apresentaram resultados antimicrobianos promissores e que o extrato Hex e AcOEt de *M. caiuia* foram os

mais sensível a bactéria *S. aureus*, com valores de CMI e CMM abaixo de 1 mg/mL. Esta espécie foi submetida a novos testes de microdiluição com isolados clínicos de *S. aureus* conforme mostra Tabela 9,10 e 11.

Tabela 9: Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos extratos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de *Miconia caiuia* (mg/ mL) em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* Oxacilina Resistentes (ORSAS) - UFPEDA.

ORSAS de <i>Staphylococcus aureus</i>									
Extratos	UFPEDA 671	UFPEDA 705	UFPEDA 709	UFPEDA 719	UFPEDA 725	UFPEDA 728	UFPEDA 729	UFPEDA 731	UFPEDA 732
	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB
<i>M. caiuia</i> Hex	0,23 / 3,75	1,87 / 3,75	0,47 / 7,5	0,23 / 0,94	0,47 / 0,47	0,23 / 0,47	0,94 / 0,94	0,23 / 0,47	0,23 / 0,23
<i>M. caiuia</i> AcEOt	0,23 / 3,75	3,75 / 7,5	0,93 / 7,5	0,23 / 0,94	0,47 / 0,94	0,94 / 1,87	0,94 / 1,87	0,94 / 1,87	0,94 / 1,87
<i>M. caiuia</i> MeOH	3,75 / 7,5	7,5 / 15,0	7,5 / 15,0	7,5 / 15,0	7,5 / 3,75	7,5 / 15,0	7,5 / 15,0	7,5 / 15,0	7,5 / 15,0

Tabela 10: Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos extratos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de *Miconia caiuia* (mg/mL) em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* - TESTE D+ (UFPEDA).

<i>Staphylococcus aureus</i> – Teste D+							
Extratos	UFPEDA 670	UFPEDA 691	UFPEDA 700	UFPEDA 718	UFPEDA 719	UFPEDA 729	UFPEDA 730
	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB
<i>M. caiuia</i> Hex	0,05 / 0,94	0,12 / 0,23	0,47 / 0,94	0,23 / 7,5	0,23 / 0,94	0,94 / 0,94	0,94 / 0,94
<i>M. caiuia</i> AcEOt	0,12 / 1,87	0,23 / 0,47	0,47 / 7,5	0,23 / 0,94	0,23 / 0,94	0,94 / 1,87	0,94 / 1,87
<i>M. caiuia</i> MeOH	7,5 / 15,0	7,5 / 15,0	3,75 / 15,0	7,5 / 15,0	7,5 / 15,0	7,5 / 15,0	7,5 / 15,0

Tabela 11: Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos extratos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de *Miconia caiuia* (mg/ mL) em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* com perfil de Sensibilidade ou Resistência a Clindamicina e Eritromicina - UFPEDA.

<i>Staphylococcus aureus</i> - UFPEDA			
Extratos	UFPEDA 672 CMI/ CMB	UFPEDA 707 CMI/ CMB	UFPEDA 711 CMI/ CMB
<i>M. caiuia</i> Hex	0,23 / 0,23	0,23/ 0,47	0,47 / 3,75
<i>M. caiuia</i> AcEOt	0,94 / 0,47	0,23 / 7,5	0,47 / 7,5
<i>M. caiuia</i> MeOH	7,5 / 15,0	7,5 / 7,5	7,5 / 15,0

Os resultados expressos na Tabela 9 indica que os extratos em hex e AcOEt de *M. caiuia* apresentaram valores de CMI entre 0,23- 0,94 mg/mL para os isolados de *S. aureus* (ORSAS) testados, com exceção para o isolado 705 (ferida operatória), que os valores de CMI foram 1,87 mg/mL e 3,75 mg/mL, respectivamente. O extrato metanólico se mostrou menos ativo, se comparado aos demais.

O extrato em hexano de *M. caiuia* inibiu de cepas de *S. aureus* com perfil de resistência Teste D+ em concentrações inferiores a 1 mg/mL. Para *S. aureus* 670 (UFPEDA), isolada de urina, a CMI foi de 0,05 mg/mL, já para *S. aureus* 691 (UFPEDA), isolada da ponta de cateter, a CMI foi 0,12 mg/mL (Tabela 10).

A análise dos resultados expressos na Tabela 11 mostra que os extratos Hex e AcOEt de *M. caiuia* apresentaram CMI de 0,23 mg/mL frente ao microrganismo isolado da secreção traqueal (UFPEDA 707) que possui perfil de resistência ao antibiótico clindamicina. Para as amostras sensíveis a clindamicina e eritromicina (UFPEDA 672 e UFPEDA 7110) os extratos inibiram o crescimento bacteriano nas concentrações que variaram entre 0,23 e 0,94 mg/mL.

Adicionalmente, foi realizado um novo ensaio de Concentração Mínima Inibitória e Microbicida com os três extratos orgânicos de *M. caiuia* em outras duas cepas de bactérias do gênero *Staphylococcus*: *S. saprophyticus* (UFPEDA 823) e *S. epidermidis* (UFPEDA 183); outra espécie de Bacilo: *Bacillus cereus* (UFPEDA 764) e duas bactérias Gram-negativas: *Salmonella enteritidis* (UFPEDA 415) e *Shigella sonnei* (413) com intuito de ainda verificar a atividade antimicrobiana da espécie (Tabela 12).

Tabela 12: Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos extratos em hexano (HEX), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de *Miconia caiuia* (mg/ mL).

Extratos	Microrganismos UFPEDA				
	UFPEDA 183	UFPEDA 413	UFPEDA 415	UFPEDA 764	UFPEDA 823
	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB	CMI/ CMB
<i>M. caiuia</i> Hex	1,87 / 3,75	0,47 / 3,75	0,23 / 0,47	0,23 / 0,23	0,12 / 0,23
<i>M. caiuia</i> AcEOt	1,87 / 15,0	0,47 / 7,5	0,47 / 7,5	0,47 / 0,94	0,48 / 0,93
<i>M. caiuia</i> MeOH	1,87 / 15,0	7,5 / 15,0	7,5 / 15,0	7,5 / 15,0	7,5 / 15,0

A Tabela 12 confirma a atividade antimicrobiana da espécie *M. caiuia* frente a outros microrganismos do gênero *Staphylococcus*. Os valores CMI para *S. saprophyticus* mostraram-se bem próximos aos obtidos no ensaio realizado com os *S. aureus*. Entretanto, para as bactérias gram- negativas testadas anteriormente, os extratos de *M. caiuia* não haviam apresentados resultados significativos, diferente do que ocorreu com as amostras: UFPEDA 413 e UFPEDA 415, onde os outros hexânico e acetato de etila tiveram valores de CMI entre 0,23 e 0,47 mg/mL.

O extrato metanólico da espécie *M. minutiflora* foi estudado frente as amostras clínicas de *S. aureus*, *B. cereus* e *C. albicans*, os valores de CMI foram de 0,625 mg/mL para as bactérias Gram- positivas e CMI de 2,5 mg/mL para a levedura. Estes resultados correlacionados com os obtidos durante os testes de CMI das espécies *M. affinis*, *M. caiuia* e *M. pyrifolia* evidenciam o perfil antimicrobiano do gênero.

4.9 QUÍMICA

Diante dos resultados promissores nas atividades antimicrobiana e anticâncer, *M. caiuia* foi a espécie escolhida para proceder com os estudos químicos após uma análise comparativa dos resultados obtidos nas atividades biológicas entre as espécies.

4.9.1 Coluna cromatográfica líquida aberta recuada com sílica

O extrato em hexano de *M. caiuia* foi fracionado através do método cromatográfico

em coluna aberta recheada com sílica em gel, eluída com sistemas hex: hex (1:1) fornecendo 15 frações que foram acompanhadas por CCD, onde foi possível perceber a presença de compostos muito apolares; hex:AcOEt (9:1) gerando 20 frações que foram reagrupadas em 7 frações; hex:AcOEt (8:2 e 5:5) originando 35 frações que também foram reunidas em 14 frações; acetona: acetona (1:1) obtendo 7 frações; acetona: MeOH (8:2 e 5:5) com 2 frações; e MeOH (1:1) com 1 fração.

Do total de 80 frações, 71 foram submetidas a análise por CCD com o intuito de identificar as frações que poderiam ser quimicamente semelhantes. Após a análise restaram 25 frações, as mesmas foram renomeadas e tiveram seu rendimento final expressos em miligramas (mg), conforme mostra a Tabela 13.

O rendimento (mg) das frações foi muito diferente. Vinte e uma frações apresentaram valores que variaram entre 0,1- 50 mg. Apenas as frações 20, 21, 24 e 67 apresentaram rendimento superior a 50 mg, destacam-se as frações: F.20 e F.21 pelo rendimento de 489,7 mg e 255,6 mg, respectivamente.

As frações 78, 79 e 80 sofreram processo de cristalização espontânea, por apresentar estruturas cristalinas semelhantes foram reunidas em uma única amostra e enviada para análise de identificação do(s) composto(s) por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) que ainda está em andamento.

Tabela 13: Rendimento das frações do extrativo de *M. caiuia*.

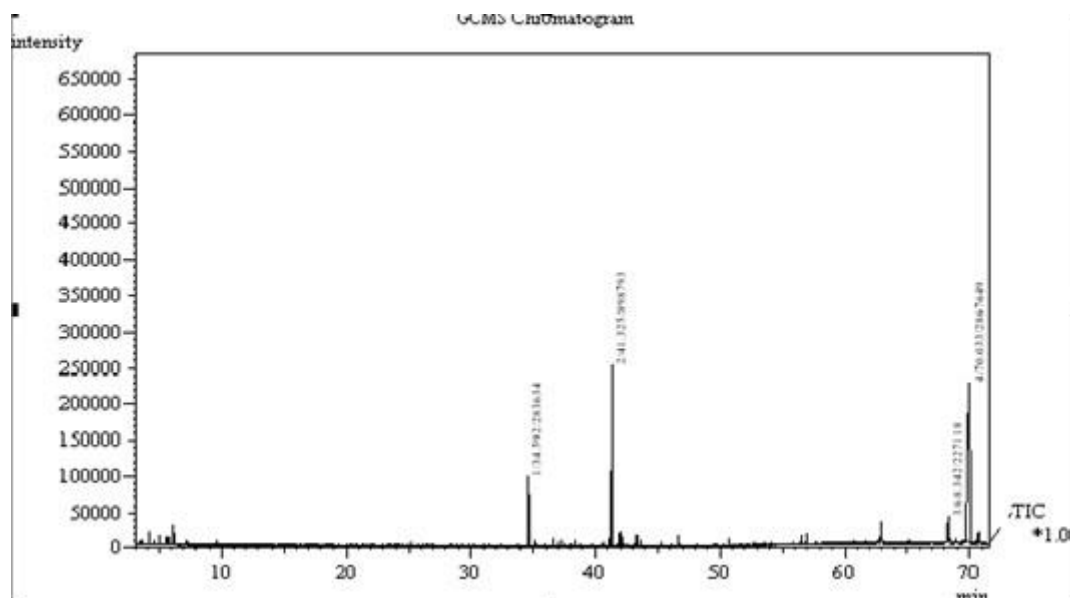
FRAÇÕES	RENDIMENTO
F.19 <i>M. caiuia</i> hex	0,1 mg
F.20 <i>M. caiuia</i> hex	489,7 mg
F.21 <i>M. caiuia</i> hex	255,6 mg
F.24 <i>M. caiuia</i> hex	85,0 mg
F.27 <i>M. caiuia</i> hex	45,5 mg
F.29 <i>M. caiuia</i> hex	18,1 mg
F. 33 <i>M. caiuia</i> hex	48,7 mg
F.37 <i>M. caiuia</i> hex	17,4 mg
F.38 <i>M. caiuia</i> hex	7,5 mg
F.39 <i>M. caiuia</i> hex	26,0 mg
F.44 <i>M. caiuia</i> hex	7,1 mg
F.45 <i>M. caiuia</i> hex	0,7 mg
F.47 <i>M. caiuia</i> hex	9,6 mg
F.49 <i>M. caiuia</i> hex	3,0 mg
F.50 <i>M. caiuia</i> hex	21,6 mg
F.52 <i>M. caiuia</i> hex	28,9 mg
F.54 <i>M. caiuia</i> hex	8,2 mg
F.55 <i>M. caiuia</i> hex	25,8 mg
F.56 <i>M. caiuia</i> hex	5,6 mg
F.58 <i>M. caiuia</i> hex	16,2 mg
F.61 <i>M. caiuia</i> hex	3,9 mg
F.64 <i>M. caiuia</i> hex	5,0 mg
F.67 <i>M. caiuia</i> hex	53,7 mg
F.69 <i>M. caiuia</i> hex	12,3 mg
F.70 <i>M. caiuia</i> hex	1,5 mg

4.9.2 Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

As 25 frações de *M. caiuia* foram analisadas por GC-EMs. O cromatograma obtido foi baseado na biblioteca de espectros NIST 11 e a elucidação das amostras foram realizadas com base no índice de similaridade entre os compostos em comparação com os dados disponíveis na biblioteca e na literatura, conforme a seguir. Vale ressaltar, que alguns compostos não puderam ser identificados devido à baixa resolução em alguns picos quando comparados com a biblioteca disponível.

Elucidação dos compostos identificados na Fração 20.

Figura 11: Cromatograma GCMS da Fração 20.



A Figura 1 mostra o cromatograma obtido pelo GCMS, nele foi possível identificar quatros picos que apresentaram fragmentos característicos e intensidade m/z, levando em consideração o tempo de retenção e área % (Tabela 14).

Tabela 14: Dados da análise do cromatograma da Fração 20.

Picos	Tempo de Retenção	Área (%)	Pico base (m/z)
1	34.592	283634	43.05
2	41.325	898793	71.15
3	68.342	227118	43.10
4	70.033	2867649	218.30

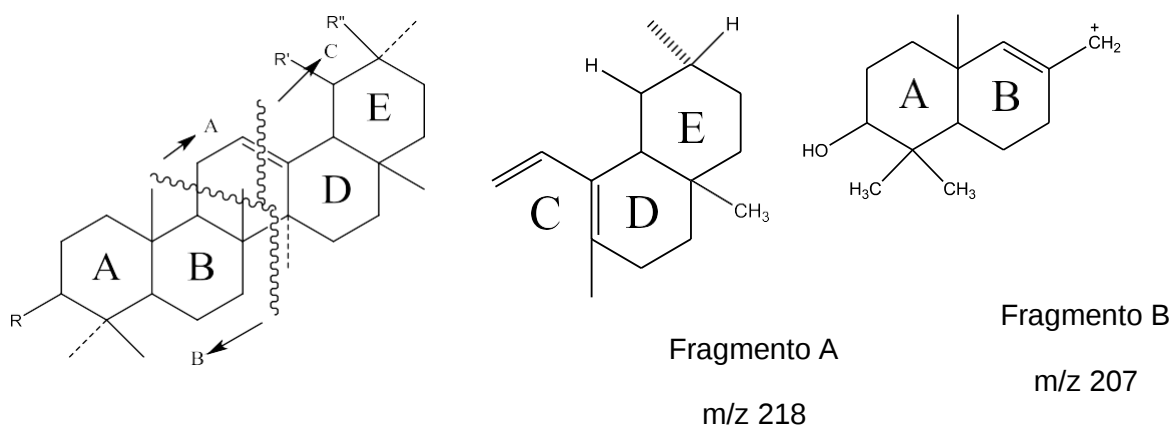
A fração 20 se apresentou com um sólido branco (aspecto visível), solúvel no sistema hex:AcOEt, foi analisada por CCD onde foi possível verificar o surgimento de três bandas com coloração roxa ao ser revelada com o anisaldeído, indicando a presença de precursores terpenoides. A identificação dos 4 picos está representadas na Tabela 15.

Tabela 15: Elucidação das estruturas químicas presentes na Fração 20.

Picos	Índice de similaridade	Fórmula molecular	Peso molecular	Substâncias
1	86%	C ₁₉ H ₃₈ O	282 g/mol	2-Nonadecanone
2	90 %	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	338 g/mol	Fitol
3	87 %	C ₂₀ H ₄₀ O	296 g/mol	1-Etil-Octadecane
4	91 %	C ₃₀ H ₅₀ O	426 g/mol	β-amirina (olean-12-en-3β-ol)

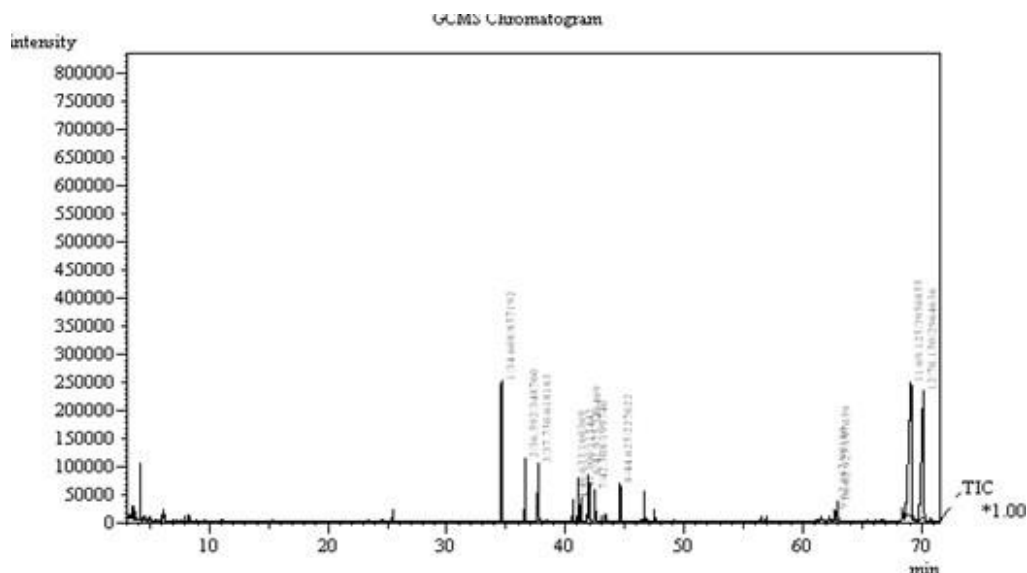
Dentre as substâncias identificadas na fração 20, o quarto pico (RT 70 minutos) foi o mais significativo, com perfil de triterpeno, com fragmentos principais e intensidades m/z 426 (4), m/z 218 (100), m/z 207 (7), m/z 203 (50), m/z 189 (20), m/z 133 (10). A presença do íon molecular em m/z 426 e o pico base m/z 218 (Fig. 2, Fragmento A) são característicos de triterpenos insaturados do tipo oleanano e ursano insaturados em C-12 e substituídos em C-17. A presença do pico base em m/z 218 (100) seguido da presença do pico m/z 203 com intensidade relevante e que se refere ao fragmento A-15 (Fig. 2, fragmento B) indica que se trata de uma amirina. Além disso, observa-se que o pico m/z 203 é duas vezes mais intenso que o pico m/z 189 o que é indicativo de uma estrutura do tipo olean-12-en-3-ol (FINGOLO et al., 2013). Logo a partir destes dados, pode-se atribuir ao referido composto a fórmula molecular C₃₀H₅₀O que é coerente com o Olean-12-en-3-ol ou β-amirina. A comparação com a literatura e a biblioteca de espectros de massas da NIST 11 confirma esta proposta uma vez que o pico 4 apresentou índice de similaridade de 91 % com a β- amirina.

Figura 12: Esquema geral da fragmentação de triterpenos pentacíclicos do tipo ursano e oleanano e os fragmentos comuns obtidos



Elucidação dos compostos identificados na Fração 21.

Figura 13: Cromatograma GCMS da Fração 21.



A figura 3 mostra o cromatograma onde estão presentes doze picos com os fragmentos e intensidade m/z; Tempo de retenção e área % descritos na Tabela 16.

Tabela 16: Dados da análise do cromatograma da Fração 21.

Picos	Tempo de Retenção	Área (%)	Pico base (m/z)
1	34.608	857192	43.00
2	36.592	348700	43.05
3	37.750	618183	43.05
4	40.633	160369	85.05
5	41.300	115442	71.10
6	41.975	346469	55.05
7	42.508	199740	43.05
8	44.625	227022	43.05
9	62.667	99180	165.10
10	62.925	197059	43.05
11	69.125	3950855	43.05
12	70.150	2964636	218.20

Os compostos identificados na fração 21 estão descritos na Tabela 17, conforme a seguir.

Tabela 17: Elucidação das estruturas químicas presentes na Fração 21

Picos	Índice de similaridade	Fórmula molecular	Peso molecular	Substâncias
1	88 %	C ₁₈ H ₃₆ O	268 g/mol	2-pentadecanone
2	86 %	C ₂₀ H ₄₀ O	296 g/mol	1-Etil- octadecanone
3	90 %	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256 g/mol	Ácido n-Hexadecanoico
4	80 %	C ₁₈ H ₃₇ I	380 g/mol	1-Iodo- octadecane
5	86 %	C ₂₀ H ₄₀ O	296 g/mol	Fitol
6	87 %	C ₁₄ H ₂₈	196 g/mol	5-Tetradecene
7	88 %	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284 g/mol	Ácido Esteriaco
8	89 %	C ₃₅ H ₇₀ O	490 g/mol	17-Pentatriacontene
9	82 %	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430 g/mol	Vitamina E
10	-	-	-	Não- identificado
11	93 %	C ₂₉ H ₅₀ O	414 g/mol	β- sitosterol
12	83 %	C ₃₀ H ₅₀ O	426 g/mol	β –amirina (olean-12-en-3-ol)

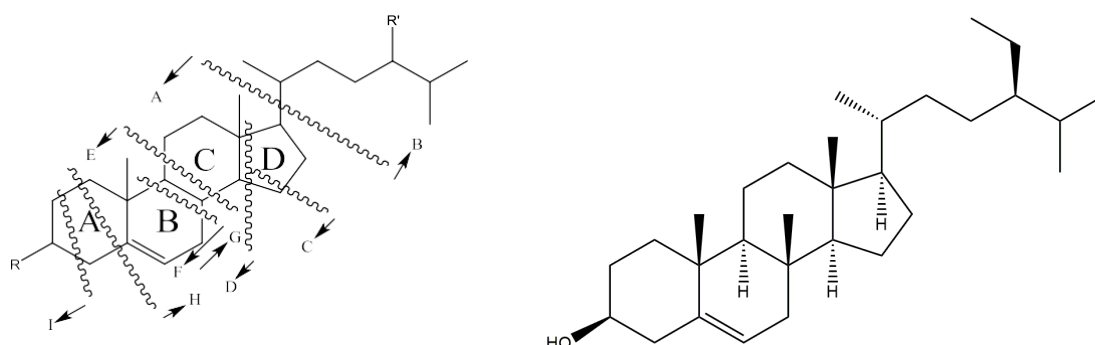
As substâncias de interesse identificadas na fração 21 encontram-se nos picos 11 (RT 69 minutos) e no pico 12 (RT 70 minutos). O pico 11 tem o perfil de esteroides com fragmentos principais e intensidades m/z 414 (25), m/z 396 (3), 273 (4), m/z 255 (4), m/z 231 (3) e m/z 217 (4), com íon molecular m/z 414 seguido do pico m/z 399 (M-15) e o pico base m/z 43. A presença do íon molecular em m/z 414 seguido do pico m/z 399 (M-15) referente a perda de metila característica, do pico m/z 396 (M-18) referente a perda de água, m/z 381 (M-15-18) referente a perda de metila e água, m/z 271 referente a perda da cadeia lateral sugerem a presença de um esteroide com cadeia lateral com formula molecular C₁₀H₂₁.

Já os picos m/z 329 (M-85), 303 (M-111), 275 (M-139) referentes a clivagem do anel B sugerem instauração em C-5. Os picos m/z 246, 232 (anéis ABC), 231 (246-metila), 213 (231-H₂O) referentes a quebra do anel D, picos m/z 163, 145 referentes a quebra do anel C, e pico m/z 138, 120 (138-H₂O) e 105 (120-metila) referente a clivagem do anel B sugerem apenas uma substituição em C-3 por uma hidroxila e confirmam a insaturação em C-5. Logo a partir destes dados o composto isolado é o β-sitosterol de formula molecular C₂₉H₅₀O.

O β - sitosterol apresenta pico intenso de m/z 217, devido à perda de água em conjunto com dois átomos de hidrogênio provenientes do núcleo esteroidal provenientes de uma mudança de conformação do íon molecular. Além disso, o fragmento m/z 273 obtido por intermédio da quebra da ligação entre os carbonos C17-C20 são características peculiares dos fitoesteróis (ERICSSON; IVONNE, 2009). Segundo a biblioteca NIST 11, o pico 11 apresenta 93% de índice de similaridade com o β - sitosterol, com peso molecular de 414g/mol (Figura 4).

O estudo químico dos extrativos de outras espécies de *Miconia* também identificaram a presença de esteroides. O β - sitosterol isolado de *M. caiuia* foi encontrado nas seguintes espécies: *M. albicans* (MACARI et al., 1990); *M. cabucu*, *M. ligustroides* (CUNHA et al., 2003); *M. sellowiana*, *M. rubiginosae* *M. pepericarpa* (CREVELIN et al., 2006).

Figura 14: Esquema geral da fragmentação do β - sitosterol com os fragmentos comuns btidos

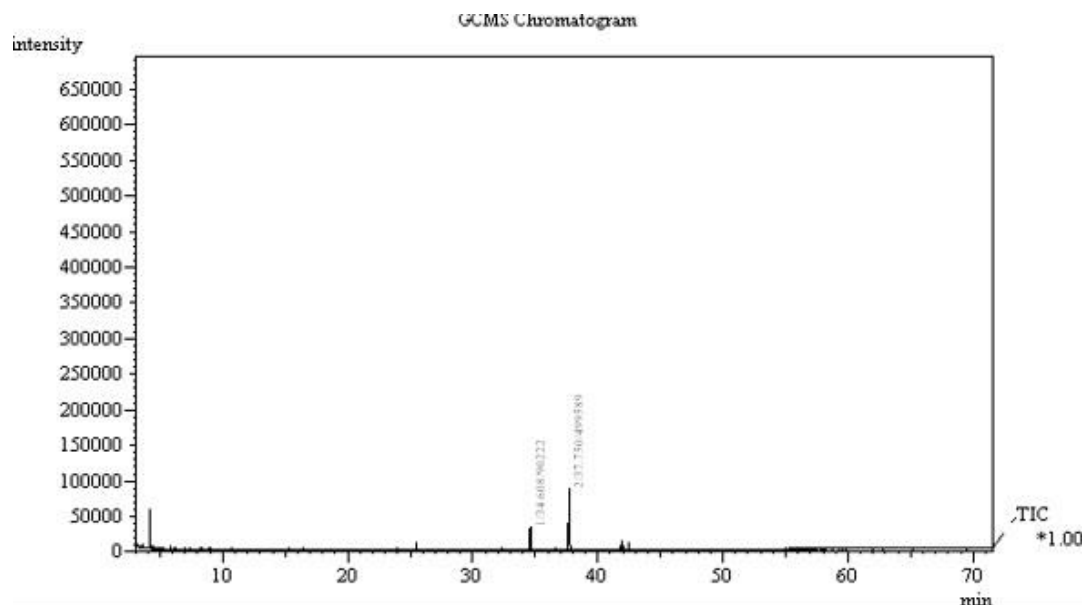


O pico 12, da F.21, apresenta perfil de triterpeno, com fragmentos principais e intensidades m/z 426 (3), m/z 218 (100), m/z 207 (7), m/z 203 (55), m/z 189 (20), m/z 133 (9). A presença do íon molecular em m/z 426 e o pico base m/z 218 são característicos de triterpenos insaturados. Com índice de similaridade de 83 %, segundo a biblioteca utilizada, o pico 12 apresenta a β -amirina, substância também identificada na fração 20.

A identificação de β -amirinas em investigações químicas de outras espécies de *Miconia*: *M. rubiginosa* (CREVELIN et al., 2006); *M. albicans* (PIERONI et al., 2011); *M. cabucu*, *M. pepericarpa* e *M. sellowiana* (VÁZQUEZ, 2012), *M. ligustroides* (CUNHA et al., 2003a) corrobora com os achados deste trabalho.

Elucidação dos compostos identificados na Fração 24.

Figura 15: Cromatograma GCMS da Fração 24.



A figura 5 mostra o cromatograma da fração 24 onde estão representados dois picos com fragmentos, tempo de retenção e intensidade m/z bem próximos (Tabela 18).

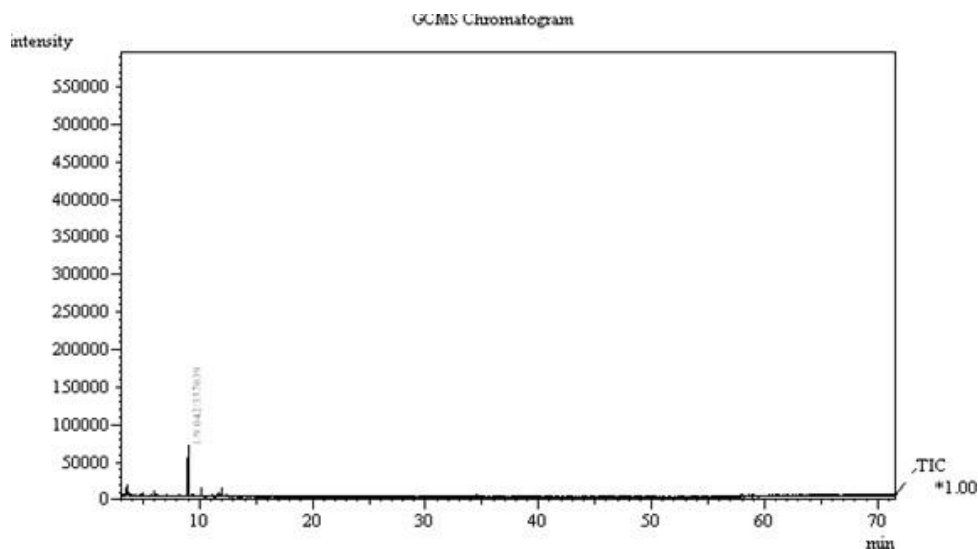
Tabela 18: Dados do cromatograma da Fração 24.

Picos	Tempo de Retenção	Área (%)	Pico base (m/z)
1	34.608	90222	43.00
2	37.750	499589	43.05

A similaridade dos dados obtidos é confirmada através da análise com a biblioteca disponível, o pico 1 apresentou os fragmentos e intensidades m/z (109), m/z (85), m/z (71), m/z (58) e m/z (48), o composto identificado com 88 % de similaridade foi 6,10-dimetil-2-Undecano, com massa molecular de 198 g/mol e fórmula química $\text{CH}_{13}\text{H}_{26}\text{O}$. Já pico 2 os fragmentos e intensidades foram m/z (256), m/z (213), m/z (185), m/z (171), m/z (157), m/z (129), m/z (115), m/z (97), m/z (83), m/z (73), m/z (60) e m/z (48), com 87 % de similaridade e massa molecular de 256 g/mol o composto identificado foi o ácido n-Hexadecanoico ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$).

Elucidação dos compostos identificados na Fração 33.

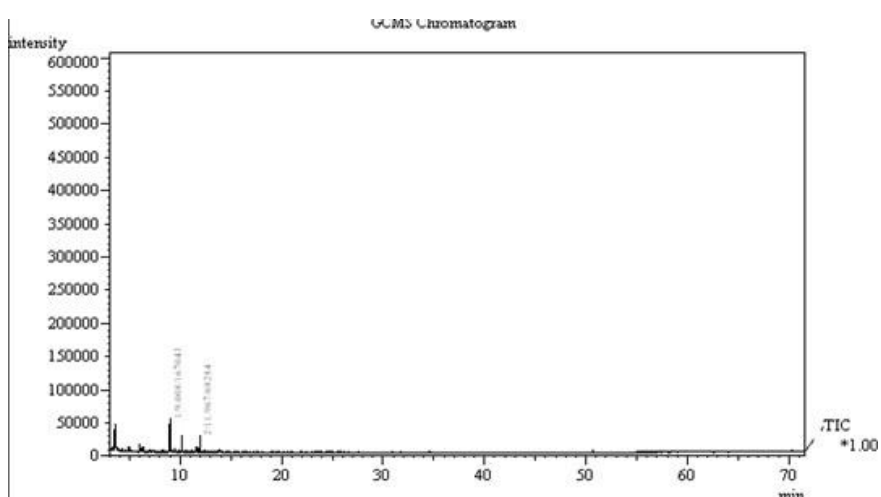
Figura 16: Cromatograma GCMS da Fração 33.



Apenas 1 único pico foi detectado na fração 33, com tempo de retenção de 9.04 minutos, a área % (357039), fragmentos e intensidade m/z (43.0) foi identificado com 84 % de similaridade como 2-4-dimetil-pentanal com fórmula molecular de $C_7H_{14}O$ e peso molecular de 114 mg/mol.

Elucidação dos compostos identificados na Fração 71.

Figura 17: Cromatograma GCMS da Fração 71.



A análise deste cromatograma indica a presença de 2 picos: Pico 1- Tempo de retenção de 9.0 minutos, área (%) de 167043 e fragmentos e intensidades m/z (43) e Pico-2 Tempo de retenção de 11.96 minutos, área (%) de 68284 e fragmentos e intensidades m/z

(41.05). Com 84 % de similaridade o pico refere-se ao composto 4,4-dimetil-2-Pentanone ($C_7H_{14}O$) com peso molecular de 114 mg/mol. Já no pico a substância identificada foi 2-Furanone ($C_8H_8O_2$) com 74 % de índice de similaridade e peso molecular de 112 mg/mol.

As frações que tiveram suas estruturas químicas identificadas e massa suficiente mínima para mensurar sua atividade biológica, foi submetida ao ensaio de citotoxicidade para verificar se estruturas eram biologicamente ativas para inibir o crescimento de células neoplásicas (Tabela 19).

Tabela 19: CI_{50} das frações em hexano (Hex) de *Miconia caiuia* em células neoplásicas, através do ensaio colorimétrico MTT, após 72 horas de tratamento na concentração inicial de 25 $\mu\text{g/mL}$.

Amostras de <i>M. caiuia</i> (Hex)	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) Intervalo de Confiança (IC 95%)		
	HL-60	K-562	MOLT-4
Fração 21	2,27 (1,47 - 3,49)	3,17 (2,36 - 4,25)	2,34 (1,83 - 2,98)
Fração 24	4,38 (3,75 - 5,12)	3,91 (3,0 - 5,0)	2,87 (2,15 - 3,84)
Fração 33	4,91 (3,76 - 6,42)	7,61 (6,46 - 8,9)	7,17 (4,87 - 10,54)
Fração 71	6,71 (4,96 - 9,0)	8,39 (6,33 - 11,12)	6,66 (4,23 - 10,50)

Os esteroides e os triterpenos são geralmente estudados por se apresentar ativos para diversas atividades de interesse biológico, como por exemplo, a atividade antimicrobiana. Encontrados em extratos e/ou frações de vegetais, essas substâncias são comumente isoladas com solventes mais apolares, que no referido trabalho, foi identificado nas frações F.20 e F.21 do extrativo em hexânico de *M. caiuia*. Com os resultados obtidos na atividade citotóxica, é possível observar que as F.21, F.24, F.33 e F.71 inibiram significativamente o crescimento das linhagens de leucemia testadas (HL60, K-562 e MOLT-4). A fração F.21, apresentou CI_{50} 2,27 $\mu\text{g/mL}$ para HL- 60 (leucemia promielocítica aguda); CI_{50} 3,17 $\mu\text{g/mL}$ para K562 (leucemia mieloide crônica) e CI_{50} 2,34 $\mu\text{g/mL}$ para MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda). Esses resultados sugerem atividade relevante do(s) composto(s) identificado(s) nesta fração por Espectrometria de Massas (EM), principalmente pelas substâncias β -amirina e β -sitosterol.

Vechia e colaboradores (2009) relatam a utilização de plantas que apresentam os triterpenos do tipo ácido oleanólico e o isômero ácido ursólico para fins terapêuticos com efeitos anti- inflamatório, analgésico, hepatoprotetor e sedativo. As abordagens farmacológicas dessas substâncias se estendem a boa atividade anticancerígena e a baixa toxicidade, caracterizando estes constituintes químicos candidatos promissores para auxiliar no tratamento do câncer. Na literatura, estudos anticancerígenos *in vivo* com esses triterpenos também verificaram o bloqueio da progressão tumoral (OGURO, et. al.,1998), do desenvolvimento de tumores implantados em camundongos (HSU, YANG; 1997) e indução da diferenciação celular, *in vitro* (LEE, et. al., 1994), ressaltando a continuidade das investigações farmacológicas com β -amirina identificada na F.20 e F.21.

4.9.3 Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas- LCMS

A análise e elucidação dos compostos químicos presentes nos extratos em AcOEt e MeOH de *M. caiuia* ainda estão em andamento.

5 CONCLUSÕES

Os extratos brutos de *M. affinis*, *M. caiuia* e *M. pyrifolia* mostraram-se ativos para as atividades biológicas testadas. A atividade citotóxica das espécies, avaliada pelo método do MTT, caracterizou os extrativos de *Miconia* com capacidade de inibir a proliferação das linhagens cancerígenas testadas, destacando o potencial anticancerígeno sobre as linhagens de leucemia (HL- 60, K-562 e MOLTI-4). Atrelados a isto, ausência da citotoxicidade para as células normais tornam as espécies candidatas promissoras para os ensaios antitumorais mais aprofundados. A avaliação da atividade antimicrobiana demonstrou que as espécies apresentaram amplo espectro de ação, pois inibiram o crescimento microbiano de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, uma álcool-ácido- resistente e da levedura. Entre as espécies estudadas, *M. caiuia* destaca-se com atividade relevante para bactérias Gram-positivas. Isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* foram utilizados com o intuito de investigar a eficácia antimicrobiana da espécie e a partir dos resultados obtidos infere-se que o extrato em hexano apresenta atividade superior aos demais extratos orgânicos da espécie. Com o perfil fitoquímico e a análise dos constituintes químicos presentes no extrato orgânico mais apolar foi possível associar os resultados promissores de *M. caiuia* com os esteroides e triterpenos já descritos na literatura. Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados para avaliar essas substâncias identificadas individualmente.

REFERÊNCIAS

- ALLEY, M. C. et al. Feasibility of drugs screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v.48, p. 589-601, 1988.
- ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo celular específicos e ciclo celular não específico que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.
- AMORIM, E. L. C. et al. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Func acosyst and communit**, v. 2, p. 88-94, 2008.
- ANDRADE, S. et al. A. Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: time for local guidelines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101 (7): p. 741-748, 2006.
- ANVISA. **Fitoterápicos: Regulamentação de Fitoterápicos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterápicos/leis>>. Acesso em: 6 jan.2017.
- ANVISA. Resistência Microbiana: Mecanismos e Impacto clínico. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos**. 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mec_bomba.htm>. Acesso em: 6 jan.2017.
- AQUINO, D. S., BARROS, J. A. C., SILVA, M. D. P. A Self-medication and health academic staff: automedicação e os acadêmicos da área de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15 (5):p. 2533-2538, 2010.
- ARAÚJO, I. S. **Atividade antimicrobiana de plantas aromáticas que ocorrem no estado do Pará**. 2011. 103.f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.
- ARIAS, M. V. B., CARRILHO, C. M. D. M. Antimicrobial resistance in animals and in human being. There is reason for concern? **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n 2, p. 775-790, 2012.
- ASKOURA, M. et al. Efflux Pump Inhibitors (EPIs) as New Antimicrobial Agents Against *Pseudomonas aeruginosa*. **Libyan Journal of Medicine**, v. 6, p. 1-8, 2011.
- BARDON, A. et al. Bioactive plants from Argentina and Bolivia. **Fitoterapia**, v. 78, p. 227-231, 2007.
- BARROSO, P. R. **Fitoquímica e atividades biológicas de *Miconia ferruginata* DC. (Melastomataceae)**. 2015. 255 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Vale de Jequitinhonha e Murici- UFVJM, 2015.
- BAUMGRATZ, J. F. A., CHIAVEGATTO, B. Nova espécie de *Miconia* Ruiz & Pav.

(Melastomataceae) para Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica. Brasilica**, v. 20(2): p. 483-486, 2006.

BAUMGRATZ, J. F. A. et al. Melastomataceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB161>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 42-51, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of a free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm-wiss. U-Technol**, v. 25, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica, Brasília, Brasil. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa, 2006**: Incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, p.124, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **ABC do câncer**: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: Inca, p.128, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2016**: Incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, p. 124, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica, Brasília, Brasil. **Uso de Plantas Medicinais e Fitoterápicos sobre 161**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRITO, M. A., CORDEIRO, B. C. The need of new antibiotics: Necessidade de novos antibióticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 4, p. 247-249, 2012.

BUSSMANN, R.W. et al. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **Journal Ethnopharmacology**, v. 132 (1): p. 101-108. 2010.

CÂNDIDO, C., LUZ, G., MACHADO, J., CARGNIN, A. B. A carcinogênese e o câncer de mama. **Revista Maiêutica**, v. 4, n. 1, p. 45-52, 2016.

CARVALHO, P.; TIRNAUER, J. S.; PELLMAN, D. Surfing on microtubule ends. **Trends Cell Biology**, v. 5, p. 229-237, 2003.

CELOTTO, A. C. et al. Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of the crude extracts of three *Miconia* species. **Brasilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 339-340, 2003.

CHAGAS, E. C. O. **O gênero *Miconia* ruiz & pav. (melastomataceae) na floresta atlântica do nordeste oriental**. Dissertação. (Mestrado em Biologia Vegetal)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

CHAGAS, E. C. O., BARBOSA, M. R. V. B., GOLDENBERG, R. A new species of *Miconia* (Melastomataceae, Miconieae) from northeastern Brazil. **Brittonia**, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**, M02-A11. 11. Ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. O Studies of the anticancer potencial of plants used in Bangladeshi folk medicine. **Journal Ethnopharmacology**, v. 99, p. 21-30, 2005.

CREVELIN, E. J. et al. Identification of Biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using high-resolution gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 827- 830, 2006.

CRUZ, A. V. M., KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v.11(1): p.47-52. 2004.

CULLINANE, C., CUTTIS, S. M. M., VANROSMALLEN, A., PHILLIPS, D. R. Formation of Adriamycin- DNA adducts in vitro. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 2296, 1994.

CUNHA, W. R. et al. Avaliação da Atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorções abdominais em camundongos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 84, n. 2, p. 47-49, 2003 a.

CUNHA, W. R. et al. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorções abdominais em camundongos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 84, n. 2, p. 47-49, 2003b.

CUNHA, W. R. et al. In vitro trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. **Planta Medica**, v. 69, p. 474-478, 2003 b.

CUNHA, W. R. et al. A study of the trypanocidal activity of triterpenes acids isolated from *Miconia* species. **Phytoterapy Research**, v. 20, p. 474-478, 2006.

CUNHA, W.R. et al. *In vitro* inhibition of tumor cell growth by *Miconia fallax*. **Pharmaceutical Biology**, v.46, p. 292-294, 2008.

CUNHA, M. R. et al. Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of *Miconia ligustroides*, isolated triterpene acids, and ursolic acid derivatives. **Pharmaceutical Biology**, 48(2): p. 166 - 169, 2010.

CUNICO, M. M. et al. Atividade anti-microbiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14. n. 2, p. 97- 103, Jul/ dez. 2004.

DALLA VECHIA, L., GNOATTO, S. B. C., GOSMANN, G. Derivados Oleananos e Ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-

inflamatória e antioxidante. **Química nova**, v. 32, n.5, p. 1245-1252, 2009.

DAVIES, J., DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, p. 417- 433, 2010.

DELCOUR, A. H. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 5, p. 808–816, 2009.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. **West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.**, 2002.

DOYLE, M. P. et al. Antimicrobial Resistance: Challenges and Perspectives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 234-248, 2013.

DRUMMOND, G. M. et al. Biodiversidade em Minas Gerais: Um Atlas para a sua conservação, 2ª edição. **Fundação Biodiversitas**, p. 222, 2005.

DŽIDIĆ, S.; ŠUŠKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic Resistance in Bacteria. **Food Technology & Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 11–21, 2008.

ERICSSON, C. B. D., IVONNE, J. N. R. Sterol composition of the macromycete fungus *laetiporus sulphureus*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 2, 2009.

FERREIRA, R. O. et al. Distribution of metabolites in galleed and non-galled leaves of *Clusia lanceolata* and its antioxidante activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 617-625, 2014.

FINGOLO, C. E., SANTOS, T. S., VIANNA FILHO, M. D., KAPLAN, M. A. C. Triterpene Esters: Natural Products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae). **Molecules**, v.18, p. 4247-4256, 2013.

GATTUSO, G. et al. Flavonoid composition of citrus juices. **Molecules**, v. 12, p. 1641-1673, 2007.

GOLDENBERG, R. **O gênero Miconia Ruiz & Pav.(Melastomataceae): I. Listagens analíticas**, II. Revisão taxonômica da seção *Hypoxanthus* (Rich. ex DC.) Hook. f. 2000. P.259. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

GOLDENBERG, R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; Souza, M. L. D. R. Taxonomia de Melastomataceae no Brasil: retrospectiva, perspectivas e chave de identificação para os gêneros. **Rodriguésia**, v. 63: p. 145-161, 2012.

GOLDENBERG, R. CADDAM, M. K. **Miconia In Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB9666>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

GONTIJO D. C. et al. *Miconia latecrenata* An alternative to discovery new drugs with antibacterial and antimutagenic activities. **SILAE**, XXII, Costa Rica, 2013.

GOODMAN; GILMAN'S. **Manual of Pharmacology and Therapeutics**. Nova Iorque:

McGraw Hill, 2008.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à genética**. 9.ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 699, 2008.

GUNATILAKA, A. A. et al. Isolation, synthesis, and structure-activity relationships of bioactive benzoquinones from *Miconia lepidota* from the Suriname rainforest. **Journal Natural Products** v. 64(1): p. 2-5. 2001.

HAN, L., ZHANG, HAI-D., LUO, K., LUO, SHI-S. Optimization of ultrasound-assited extraction of total phenol from betel nut seed and evaluation of antioxidant activity *In vitro*. **Eletronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 10, n.5, 2011.

HANCOCK, R. E. W. Alterations in Outer Membrane Permeability. **Annual Review of Microbiology**, v. 38, p. 237–264, 1984.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HSU, H. Y., YANG, J. J., LIN, C. C. **Cancer Lett**, v.7, p. 111, 1997.

JORGE, R. M., LEITE, J. P. V., OLIVEIRA, A. B., TAGLIATI, C. A. Evaluations of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 14, n.1, p.93-100, 2004.

KUMAR, S. et al. **Pathology Basis of Disease**, 7 ed. WB Saunders, Chuna, p.15552, 2005.

KUMAR, S.; VARELA, M. F. Biochemistry of Bacterial Multidrug Efflux Pumps. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 4484-4495, 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Basic Pathology**, 9ª edição: ELSEVIER, 2013.

LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN, S. W. Animals models of nociception. **Pharmacology**, v.53, p. 597-652, 2011.

LEE, H. Y. et al. Inductions of differentiation in the cultured F9 teratocarcinoma stem cells by triterpene acids. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 120, p. 513, 1994.

LEITE, T.C.C. **Avaliação da atividade antimicrobiana e estudo químico de espécies do gênero *Marcetia* (Melastomataceae)**, 2009, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-UEFS, Feira de Santana, 2009.

LOPES, R. M., OLIVEIRA, T. T., NAGEM, T. J., SILVA, P. A. Flavonoides. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.17, n.1, p.18-22, 2003.

LEWINSOHN, E.; GIJZEN, M. Phytochemical diversity: The sounds of silente metabolismo. **Plant Science**, v. 176, p. 161-169, 2009.

LOWRY, J. B. The distribution and potential taxonomic value of alkylated ellagic acids. **Phytochemistry**, v. 7:p. 1803-1813. 1968.

MACARI, P. A. T.; EMERENCIANO, V. P.; FERREIRA, Z. M. G. F. S. Identificação dos triterpenos de *Miconia albicans* Triana através de análises de microcomputador. **Química Nova**, v. 13(4): p. 260-262, 1990.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25 (3): p. 429-438, 2002.

MANCINI, E. et al. Flavonoids of *Miconia alypifolia* and their antioxidant activity. **Pharmacology online**, v.2, p. 452-460, 2008.

MARTINEZ, J. L. Natural Antibiotic Resistance and Contamination by Antibiotic Resistance Determinants: the Two Ages in the Evolution of Resistance to Antimicrobials. **Frontier Microbiology**, v. 3, p. 1-3, 2012.

MELO, M. B. C. et al. O funcionamento familiar do paciente com câncer. **Psicologia em Revista**, v. 18, n. 1, p. 73-89, 2012.

MICHELIN, D. C. et al. Avaliação Antimicrobiana de extratos vegetais. **Brazilian Journal of Phamacognosy**, v. 15, p. 316-320, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p.55-63, 1983.

NAOUM, P. C. Sinalização Celular do Câncer Humano. **Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto**, SP, Brasil, 2015.

NCCLS. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras**- M 27- A 2. 2 ed. NCCLS, Wayne: USA, 2002.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility teste for bactéria that grow aerobically**- M 7- A 6. 6 ed. NCLLS, Wayne: USA, 2003.

OGURO, T., LIU, J., KLAASSEN, C. D., YOSHIDA, T. Inhibitory Effect of Oleanolic Acid on 12- O Tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Gene Expression in Mouse Skin. **Toxicology Sciencs**, v.45, p. 88-93, 1998.

OLIVEIRA, T. T. et al. Flavonoides: Potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.

OLIVEIRA G. S. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antimicrobianas, citotóxica e inibitória das catepsinas B e K de *Miconia ferruginata* (Melastomataceae)**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares)- Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2010.

PATWARDHAN, B., VAIDYA, A. B. D., CHORGHAD, M. Ayurveda and Natural Products Drug Discovery. **Current Science**,v. 86, p. 789-799, 2004.

PEÑA, Y. P. et al. Resistencia antimicrobiana en cepas de estafilococos coagulase positive aisladas en alimentos y Manipuladores. **Revista Cubana de Alimentación y Nutrición**, v. 25, p. 245-260, 2015.

PEIXOTO, J. A. et al. Antileishmanial Activity of the Hydroalcoholic Extract of *Miconia langsdorffii*, Isolated Compounds, and Semi-synthetic Derivatives. **Molecules**, v 16, p. 1825-1833, 2011.

PHMB. Poli (hexametileno biguanida). Inf. **Estrutura de bactérias Gram-negativas**. Disponível em: phmb.inf/antisepsia_e_antissepticos, 2009.

PIERONI, L. G.; REZENDE, F. M.; XIMENES, V. F.; DOKKEDAL, A. L. Antioxidant Activity and Total Phenols from the Methanolic Extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana Leaves. **Molecules**, v. 16, p. 9439-9450, 2011.

PIERONI, L. G. et al. Antioxidant Activity and Total Phenols from the Methanolic Extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana Leaves. **Molecules**, v. 16, p. 9439-9450, 2011.

PIETRO, P., PINEDA, M., AGUILAR, M. Spectrophotometric quatitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum. Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, p. 337-341, 1999.

QUEIROZ, G. M. et al. Absence of the antibacterial activity of the crude extracts and compounds isolated from *M. rubiginosa* against extended-spectrum β -lactamase producing enterobacteria. **Journal Pharmaceutica**, v.2, 2011.

RENNER, S. S. et al. **Melastomataceae. Net**. 2010. A site with information on the biodiversity of Melastomataceae. Disponível em: <<http://www.melastomataceae.net>>, 2010. Acesso em: 15 maio 2016.

REZENDE, A. R., ROMERO, R. GOLDENBERG, R. Sinopse de *Miconia* Seção *Miconia* DC. (Melastomataceae) no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 273-287. 2014.

ROCHA J. C. C.; SILVA S. N. **Oncogenética**. In: Coelho FRG, Kowalski LP. Bases da Oncologia. 2. ed. São Paulo: TECMEDD; p. 423-32, 2003.

RODRIGUES, J. et al. An unusual C6-C6'' linked flavonoid from *Miconia cabuçu*, **Phytochemistry**, v.68, p. 1781-1784, 2007.

RODRIGUES, J. et al. Secondary metabolites of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 7-8, p. 834-839, 2011.

RODRIGUES, F. A. R. et al. Mefloquine-Oxazolidine Derivates: A new Class of Anticancer Agents. **Chemical Biology of Drugs Design**, v. 83, p. 126-131, 2014.

ROE, V. A. Antibiotic Resistance: A Guide for Effective Prescribing in Women's Health. **Journal of Midwifery & Women's Health**, p. 526-952, 2010.

RUIZ, H. L., PAVÓN, J. A. Flora peruviana et chilensis prodromus. Madrid, 1794.

RIOS, J. L. RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante

Total em frutas pela captura do Radical livre DPPH. **Embrapa**, ISSN 1679-6525, Fortaleza-CE, 2007.

SANTOS, M. G. et al. Fatores de risco em radioterapia de cabeça e pescoço. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 58, n. 2, p. 191-196, 2010.

SAWADA, N. O. et al. Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. **Revista da Escola de Enfermagem**, v. 43, n. 3, p. 581-587, 2009.

SERPELONI, J. M. et al. *In vivo* assessment of DNA damage and protective effects of extracts from *Miconia* species using the comet assay and micronucleus test, **Mutagenesis**, v. 23, n. 6, p. 501-507, 2008.

SERPELONI, J. M. et al. Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: an *in vitro* analysis. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, p. 499-504, 2011.

SMITH, A. J.; OERTLE, J.; PRATO, D. Environmental Carcinogens and the Kinds of Cancers They Cause. **Open Journal of Oncology**, n. 3, v. 1, p. 1-16, 2014.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG II. 2. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2008.

SPESSOTO, M. A. et al. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae), **Journal Phytomedicine** v. 10, p. 606–609, 2003.

TARAWNEH, A. H. et al. Flavanones from *Miconia prasina*, **Journal Phytochemistry Letters**, v.7, p. 130-132, 2014.

VASCONCELOS, M. A. L. et al. Analgesic effects of crude extracts of *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Bolletino chimico Farmaceutico**, v. 142, n.8, p. 333-335, 2003.

VASCONCELOS, M. A. et al. *In vivo* Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Ursolic Acid and Oleanic Acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Zeitschrift für Naturforschung B**. v. 61, p. 477-482, 2006.

VÁZQUEZ, L. H., PALAZON, P., NAVARRO-OCAÑA, A. The pentacyclic triterpenes α - β -amyrin, a review of sources and biological activities. **In phytochemicals-A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**. Rijeka, Croatia, 2012.

VECHIA, L. D., GNOATTO, S. C. B., GOSMANN, E. G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, .5, p. 1245-12552, 2009.

VON NUSSBAUM, F. et al. Antibacterial Natural products in Medicinal Chemistry- Exodus or Revival? **Angewandte Chemie**. International Edition, v. 45, p. 5072, 2006.

WAGNER, H., BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2 ed. Nova York: Springer, 2001.

WALSH, C.; Antibiotics: Actions, Origins, Resistance, ASM Press: Washington, **Protein Science**, vol. 13: p. 3059–3060, 2004.

WHO. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. World Health Organization, 20 Avenue Appia Geneva, Switzerland, 2012.

WRIGHT G. D. Bacterial Resistance to Antibiotics: Enzymatic Degradation and Modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1451-1470, 2005.

ZAHIN, M.; AHMAD, I.; AQUIL, F. Antioxidant and Antimutagenic Activity of Carum Copticum Fruit Extracts. **Toxicology in vitro**, v. 24, p. 1243-1249, 2010.