

LAÍS AZEVEDO RODRIGUES

**BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS ANTIBACTERIANOS DE
ESPÉCIES ARBÓREAS NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R696b Rodrigues, Laís Azevedo, 1991-
2017 Bioprospeção de produtos naturais antibacterianos de
 espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica / Laís Azevedo
 Rodrigues. – Viçosa, MG, 2017.
 xvi, 79f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: João Paulo Viana Leite.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.66-79.

1. Produtos naturais - Mata Atlântica. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica
Aplicada. II. Título.

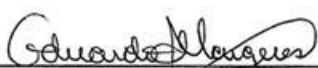
CDD 22 ed. 547.3

LAÍS AZEVEDO RODRIGUES

**BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS ANTIBACTERIANOS DE
ESPÉCIES ARBÓREAS NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA**

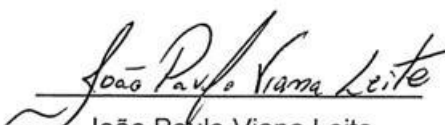
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de fevereiro de 2017.


Eduardo de Almeida Marques da Silva


Marcelo Henrique dos Santos


Andréa de Oliveira Barros Ribon
(Coorientadora)


João Paulo Viana Leite
(Orientador)

À Deus;
Aos meus pais, Eder e Terezinha;
Ao meu namorado, Ivan;
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À Deus, pois é pela fé que enfrentamos os obstáculos e obtemos vitórias.

Aos meus Pais pelo amor incondicional e por permitir que este sonho fosse possível.

À Universidade Federal de Viçosa e ao departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela infra-estrutura que permitiu a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio financeiro para a realização do trabalho.

Ao prof. João Paulo Viana Leite pela oportunidade, pela orientação, pelo acompanhamento durante toda pesquisa e pelos ensinamentos transmitidos.

À profa. Andréa de Oliveira Barros Ribon pela disponibilidade em co-orientar este trabalho, e pelas sugestões feitas na realização dos ensaios biológicos.

Ao prof. Geraldo Célio Brandão da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto e a profa. Alaíde Braga de Oliveira da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais pela obtenção dos cromatogramas por LC-MS.

Ao Alisson Andrade Almeida pela obtenção dos extratos da *BIOPROS Extract Library*, pela amizade e por se mostrar sempre disponível a ajudar.

À Letícia Monteiro Farias pelo testes realizados no HPLC e pela amizade.

À Iorrana Vieira Salustiano pelo comprometimento, ajuda nos testes fitoquímicos e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Biodiversidade pelo companheirismo e colaboração.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia Molecular pelo auxílio na realização dos testes microbiológicos.

Ao meu namorado pelo apoio, compreensão e incentivo.

Aos novos amigos Janaína, Fernanda, Thayara, Kamylla e Viktor que tornaram ainda mais especial os meus dias, pelas risadas, pelos conselhos, pelo apoio e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos meus familiares pela torcida, especialmente a minha Avó Jandira e ao meu Tio Joel, pelas infinitas orações.

Aos prof.(s) Eduardo e Marcelo, membros da banca examinadora, pela contribuição na correção e pelas sugestões neste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

BIOGRAFIA

Laís Azevedo Rodrigues, filha de Eder Fagundes Rodrigues e Terezinha Leal de Azevedo Rodrigues, nasceu em Muriaé - Minas Gerais, em 19 de setembro de 1991.

Em fevereiro de 2010, iniciou o curso de Bacharelado em Farmácia na Faculdade de Minas, FAMINAS, Muriaé-Minas Gerais, concluindo-o em dezembro de 2014.

Em março de 2015, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 10 de fevereiro de 2017.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE SIGLAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. BIODIVERSIDADE BRASILEIRA	4
2.2. ESTRATÉGIAS DE BIOPROSPECÇÃO	5
2.3. COLEÇÕES DE EXTRATOS VEGETAIS	6
2.4. COLEÇÃO DE EXTRATO BIOPROS MATA ATLÂNTICA	8
2.5. PRODUTOS NATURAIS E A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	9
2.6. RESISTÊNCIA BACTERIANA	13
3. OBJETIVOS	16
3.1. GERAL	16
3.2. ESPECÍFICOS	16
4. METODOLOGIA	16
4.1. AQUISIÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	17
4.2. ELABORAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS	17
4.3. TESTES BIOLÓGICOS	18
4.3.1. MICROORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	16
4.3.2. ENSAIO DE DIFUSÃO EM ÁGAR	16
4.3.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	17
4.3.4. DETERMINAÇÃO DO EFEITO BACTERICIDA E/OU BACTERIOSTÁTICO	18
4.3.5. INTERAÇÃO ENTRE ANTIBIÓTICO E EXTRATO	18
4.3.6. ATIVIDADE DOS EXTRATOS SOBRE BIOFILMES EM FORMAÇÃO E PRÉ-FORMADOS	20
4.4. ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS ATIVOS	24
4.4.1. FRACIONAMENTO BIOMONITORADO	24
4.4.2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	25

4.4.3.MONITORAMENTO POR HPLC-DAD DO FRACIONAMENTO BIOMONITORADO	26
4.4.4.IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA POR UPLC-UV-MS DE COMPOSTOS ATIVOS PRESENTES NA FRAÇÃO ATIVA.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1.TRIAGEM PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS FRENTE A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS.....	28
5.2.CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS EXTRATOS ATIVOS... 31	
5.3.AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DOS EXTRATOS SEM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	33
5.4.FRACIONAMENTO BIOMONITORADO DE <i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin.....	38
5.5.PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DOS COMPOSTOS PRESENTES NO EXTRATO E NAS FRAÇÕES DE <i>Miconia latecrenata</i>	39
5.6.MONITORAMENTO POR HPLC-DAD DO FRACIONAMENTO BIOMONITORADO	40
5.7.ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS FRAÇÕES de <i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin.....	43
5.8.IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS PRESENTES NA FRAÇÃO ATIVA DE <i>Miconia latecrenata</i>	47
5.9.DETERMINAÇÃO DO EFEITO BACTERICIDA E/OU BACTERIOSTÁTICO DE <i>Miconia latecrenata</i>	58
5.10.ANÁLISE DA INTERAÇÃO EXTRATO/ANTIBIÓTICO	59
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Metabólitos secundários investigados no extrato ativo, padrões e reveladores utilizados na prospecção fitoquímica.....	25
Tabela 2: Gradiente de eluição empregado na análise dos extratos e frações por HPLC.....	26
Tabela 3: Gradiente de eluição empregado nas análises dos extratos e frações por UPLC.....	27
Tabela 4: Triagem preliminar da atividade antibacteriana de 96 extratos da BIOPROS <i>Extracts Library</i> pelo teste de difusão em ágar. Os resultados estão expressos pelo comprimento do diâmetro dos halos (mm).....	29
Tabela 5: Concentração inibitória mínima (CIM) em mg/mL dos extratos ativos.....	31
Tabela 6: Atividade de extratos vegetais sobre biofilme pré-formado de <i>Staphylococcus epidermidis</i> NRS101 ATCC 359883.....	35
Tabela 7: Atividade de extratos vegetais sobre formação de biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i> NRS 101 ATCC 359883.....	36
Tabela 8: Rendimento (%) das respectivas frações do EOFML por PLL.....	39
Tabela 9: Resultado da prospecção fitoquímica realizada com o EOFML e suas respectivas frações.....	39
Tabela 10: Halos de inibição (mm) do EOFML e das frações obtidas por PLL pelo teste de difusão em ágar.....	43
Tabela 11: Concentração inibitória mínima, em mg/mL, do EOFML e das suas respectivas frações.....	44
Tabela 12: Dados encontrados na análise por UPLC-UV-MS para EOFML-AE.....	51
Tabela 13: Avaliação do tipo de interação de <i>Miconia latecrenata</i> com os antibióticos para diferentes bactérias.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alguns compostos antibacterianos derivados de produtos naturais...	3
Figura 2: Medicamentos derivados de produtos naturais.....	9
Figura 3: Estrutura química da Daptomina.....	10
Figura 4: Distribuição das amostras para o teste de Concentração Inibitória Mínima.....	20
Figura 5: Esquema da diluição seriada dos antibióticos e dos extratos para determinação do tipo de interação entre eles.....	22
Figura 6: Esquema das concentrações finais do extrato e do antibiótico para determinação do tipo de interação entre eles.....	22
Figura 7: Relação da interferência entre diferentes concentrações de três extratos vegetais e a coloração resultante da interação desses com o revelador cristal violeta no teste de formação do biofilme em <i>Staphylococcus epidermidis</i> NRS 101 (ATCC 359883).....	34
Figura 8: Impressão digital do extrato e das frações de <i>Miconia latecrenata</i> ..	42
Figura 9: Halos de inibição do EOFML e de suas respectivas frações (50 mg/mL) pelo teste de difusão em ágar contra <i>Staphylococcus aureus</i> (1) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2).....	44
Figura 10: <i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin (Melastomataceae).....	46
Figura 11: Perfil cromatográfico por UPLC-UV em 254 nm da fração de acetato de etila do EOFML.....	48
Figura 12: <i>Fingerprint</i> por ESI-MS da fração em acetato de etila de <i>Miconia latecrenata</i> : (A) modo negativo ESI ⁻ e (B) modo positivo ESI ⁺	50
Figura 13: Estrutura química da quercetina identificado no EOFML-AE.....	51
Figura 14: Espectros de massa ESI ⁻ (A) e no UV (B) referente ao flavonoide quercetina (301 m/z, T _R 2,85 min.) identificado na fração de acetato de etila de <i>Miconia latecrenata</i>	52

Figura 15: Espectros de massa ESI ⁻ (A) e no UV (B) referente ao flavonoide metoxiquercetina (315 m/z, T _R 3,48 min.) identificado na fração de acetato de etila de <i>Miconia latecrenata</i>	53
Figura 16: Espectros de massa ESI ⁻ (A) e no UV (B) referente ao derivado pentosídico de metoxiquercetina (447 m/z, T _R 3,13 min.) identificado na fração de acetato de etila de <i>Miconia latecrenata</i>	54
Figura 17: Espectros de massa ESI ⁻ (A) e no UV (B) referente ao flavonoide quercetina-3-O-ramnosideo (447 m/z, T _R 3,11 min.) identificado na fração de acetato de etila de <i>Miconia latecrenata</i>	55
Figura 18: Proposta geral de fragmentação para flavonol.....	56
Figura 19: Determinação do efeito bacteriostático do EOFML frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	58
Figura 20: Interação sinérgica entre EOFML e ampicilina para <i>Staphylococcus aureus</i> . ATCC 29213.....	61
Figura 21: Interação sinérgica entre EOFML-AE e tetraciclina para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	61
Figura 22: Interação sinérgica entre EOFML e tetraciclina para <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 23857.....	62

LISTA DE SIGLAS

BEL	BIOPROS <i>Extracts Library</i>
BHI	Infusão cérebro-coração
BHlg	Infusão cérebro-coração glicosado
BIOPROS	Bioprospecção Molecular no Uso Sustentável da Biodiversidade
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetil sulfóxido
EA	Extrato aquoso
EO	Extrato orgânico
EOFML	Extrato orgânico de folhas de <i>Miconia latecrenata</i>
EOFML-A	Extrato orgânico de folhas de <i>Miconia latecrenata</i> fração aquosa
EOFML-AE	Extrato orgânico de folhas de <i>Miconia latecrenata</i> fração de acetato de etila
EOFML-B	Extrato orgânico de folhas de <i>Miconia latecrenata</i> fração de butanol
EOFML-D	Extrato orgânico de folhas de <i>Miconia latecrenata</i> fração de diclorometano
EOFML-H	Extrato orgânico de folhas de <i>Miconia latecrenata</i> fração de hexano
EPTEA	Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental
ESI	Ionização por elétron spray
FIC	Concentração Inibitória Fracionária
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance

HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta performance acoplada a detector ultravioleta por arranjo de diodos
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
INT	Cloreto de p-iodonitrotetrazolio
MH	Muller-Hinton
MS	Espectrômetro de massas
NARSA	<i>Network of Antimicrobial Resistance in Staphylococcus</i>
NCI	Instituto Nacional do Câncer
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
PLL	Partição líquido-líquido
UFC	Unidade formadora de colônia
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNIP	Universidade Paulista
UPLC	Cromatografia líquida de ultra-performance
UPLC-UV	Cromatografia líquida de ultra-performance acoplado a detector ultravioleta
UPLC-UV-MS	Cromatografia líquida de ultra-performance com detector ultravioleta acoplado a espectrômetro de massas
UV	Ultravioleta

RESUMO

RODRIGUES, Laís Azevedo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Bioprospecção de produtos naturais antibacterianos de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica.** Orientador: João Paulo Viana Leite. Coorientadora: Andréa de Oliveira Barros Ribon.

As infecções causadas por bactérias representam atualmente sério problema de saúde pública, o que é agravado pela resistência dos patógenos aos antibióticos. Os metabólitos secundários bioativos oriundos de plantas podem contribuir para o desenvolvimento de novos antibacterianos, tornando estratégica a investigação desses compostos. BIOPROS *Extracts Library* (BEL) é uma coleção de extratos de árvores nativas da Mata Atlântica direcionada à pesquisa de bioprospecção farmacêutica. Nessa coleção, os extratos foram obtidos de folhas e caules de diferentes espécies, utilizando solventes extratores de diferentes polaridades. O objetivo deste trabalho foi bioprospectar produtos naturais antibacterianos oriundos de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica. Os extratos da BEL foram escolhidos aleatoriamente para investigação da atividade antibacteriana e 96 extratos de 24 espécies a uma concentração de 50 mg/mL foram submetidos ao teste de difusão em ágar. Para os extratos que apresentaram atividade determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e para aqueles que não inibiram o crescimento bacteriano, avaliou-se a atividade antibiofilme. Um total de 37 extratos apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e/ou *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. O fracionamento biomonitorado e testes fitoquímicos foram realizados com o extrato orgânico de folhas de *Miconia latecrenata* (DC.) Naudin (EOFML) que obteve CIM de 0,31mg/mL para *S. aureus* e 2,5 mg/mL para *P. aeruginosa*. À fração ativa foi realizada a identificação dos compostos químicos por UPLC-UV-MS, além do teste para avaliação do efeito bactericida ou bacteriostático e interação extrato/antibiótico pelo método *checkerboard*. O fracionamento biomonitorado do EOFML reduziu pela metade da CIM para *P. aeruginosa* na fração de acetato de etila. Para *S. aureus* não houve diminuição da CIM, o que sugere um sinergismo entre as classes de metabólitos encontradas. O EOFML mostrou ação bacteriostática sobre *S. aureus* e apresentou sinergismo com

ampicilina e tetraciclina para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. Identificaram-se, na fração de acetato de etila, o flavonoide quercetina e derivados, que podem ser os responsáveis pela atividade antibacteriana. Os extratos orgânicos de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston e folhas e caules de *Inga cylindrica* (Vell.) Mart demonstraram forte atividade sobre a formação de biofilme de *S. epidermidis* NRS101 ATCC 359883. Os resultados mostraram que essas espécies são promissoras para descoberta de novos antibióticos.

ABSTRACT

RODRIGUES, Laís Azevedo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Bioprospecting of native arboreal species in the Brazilian Atlantic Forest for natural antimicrobial products.** Supervisor: João Paulo Viana Leite. Co-advisor: Andréa de Oliveira Barros Ribon.

Currently, infections caused by bacteria represent a serious public health problem that is exacerbated by antibiotic resistance. Secondary bioactive metabolites from plants can contribute for the development of novel antimicrobial making the investigation of these compounds of strategic importance. BIOPROS *Extracts Library* (BEL) is a collection of extracts from native trees in the Brazilian Atlantic Forest directed for bioprospecting investigations. The extracts were obtained from leaves and twigs of different species with solvent extractors of different polarities. The aim of this work was bioprospecting of native arboreal species in the Brazilian Atlantic Forest for new antimicrobials. BEL extracts were randomly selected for antimicrobial activity investigation, 96 extracts from 24 species were submitted to agar-diffusion testing at a concentration of 50 mg/mL. For the extracts that presented antimicrobial activity, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. For those that did not inhibit bacterial growth, the anti-biofilm activity was evaluated. A total of 37 extracts presented antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and/or *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The biomonitoring fractionation and phytochemical assay were performed with the organic extract of leaves of *Miconia latecrenata* (DC.) Naudin (EOFML), which obtained a MIC of 0,31 mg/mL for *S. aureus* and 2,5 mg/mL for *P. aeruginosa*. These tests were accomplished by biomonitoring fractionation through liquid-liquid partition. Chemical compounds were identified in the active fraction through UPLC-UV-MS, besides bactericidal or bacteriostatic testing and extract/antibiotic interaction testing through *checkerboard* method. Biomonitoring fractionation of the ethyl acetate fraction of EOFML reduced MIC to half against *P. aeruginosa*. There were no reductions for *S. aureus* what suggest synergism among the settled classes of metabolites. EOFML demonstrated bacteriostatic activity against *S. aureus*. It also presented synergism with ampicillin and tetracycline against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and

B. subtilis. The flavonoid quercetin and derivatives were identified in the ethyl acetate fraction which may be responsible for the antimicrobial activity. Organic extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston leaves and *Inga cylindrica* (Vell.) Mart leaves and stalks demonstrated strong activity on *S. epidermidis* NRS101 ATCC 359883 biofilm formation. The results showed the species evaluated in this work hold promising potential for new antibiotic discoveries.

1. INTRODUÇÃO

Biodiversidade refere-se à diversidade genética encontrada em populações, espécies, comunidades, habitats e ecossistemas (BOERO, 2010). Nos últimos anos, a conservação da variabilidade genética tem sido muito discutida em fóruns internacionais como fator de segurança alimentar e de crescimento econômico, principalmente para países em desenvolvimento.

O Brasil é um dos países detentores da maior diversidade biológica do planeta, porém no âmbito científico ainda é pouco explorado. Sabe-se que a pesquisa científica pode contribuir para o uso sustentável dos ecossistemas. Sendo o Brasil possuidor de sete biomas e signatário da Convenção sobre Diversidade Biológica (1992) e dos documentos sucessores, é emergente a recuperação deste atraso científico (NEWMAN, 2016).

A Mata Atlântica é considerada uma das cinco principais áreas *hotspots* da biodiversidade mundial, sendo esse o segundo bioma mundial mais ameaçado de extinção. Tendo em vista esse cenário, a busca pela sua conservação deve ser prioridade (JOLY et al., 2014; EISENLOHR et al., 2013).

As estratégias de bioprospecção têm como objetivo explorar de forma sustentável a biodiversidade em busca de novos produtos naturais com valor econômico, social e ambiental agregado (SIMÕES et al., 2009).

Bibliotecas de extratos é uma forma eficiente de se obter uma variedade de metabólitos secundários direcionados para estudos químicos e farmacológicos, na tentativa de se desenvolver bioprodutos de interesse para a sociedade (PERROS, 2015).

Sabe-se que as plantas possuem mecanismos de defesa química contra microrganismos patogênicos, resultante da ação de moléculas oriundas do metabolismo secundário. Essas podem atuar nos mecanismos de resistência bacteriana, sendo esses divididos em grupos, os que diminuem a concentração do antibiótico através das bombas de efluxo, aqueles que modificam o alvo do antibiótico por mutações genéticas e também os que inativam os antibióticos por catálise enzimática (LEWIS e ASUBEL, 2006; JONES e DANGL, 2006; GONZÁLEZ et al., 2009; BLAIR et al., 2015).

De 1981 a 2014, 140 novos compostos antibacterianos foram descobertos para tratamento de infecções, dentre os quais 71 são derivados de produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2016).

Recentemente, a partir de uma triagem com diversos produtos naturais derivados de bactérias isoladas do solo, foi descoberta a teixobactina (Figura 1), que inibe a síntese da parede celular bacteriana (LING et al., 2015). A copsina, isolada de uma fonte fúngica, é estabilizada por seis ligações de cisteína, e apresenta boa atividade contra bactérias Gram-positivas (MALONEY, 2016). Alguns compostos ainda estão em fase de testes, como a hunanamicina A (Figura 1), isolada de uma bactéria marinha, os penicyclones A-E (Figura 1), policétidos antibacterianos com uma ciclo-hexenona altamente funcionalizada, isolados de uma espécie de *Penicillium* do mar e com atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, e alguns alcaloides, como as axinelaminas (Figura 1) que parecem funcionar por desestabilizar a membrana bacteriana (MALONEY, 2016; HERRMANN et al., 2016).

Devido à amplitude de compostos já descobertos e à infinidade de produtos naturais que ainda não se conhece quanto ao potencial biológico, a busca por novos antibióticos utilizando coleções de extratos é promissora. Principalmente por causa da resistência bacteriana, problema considerado de saúde pública e que mobiliza vários países no sentido de diminuir a mortalidade por infecções bacterianas multi-resistentes (WHO, 2015).

Neste contexto, a busca por produtos naturais bioativos utilizando coleções de extratos tem sido uma estratégia de diversos grupos de pesquisa, como a do grupo de Bioprospecção Molecular no Uso Sustentável da Biodiversidade pertencente à Universidade Federal de Viçosa, que dispõe de uma coleção de extratos oriundos de árvores nativas da Mata Atlântica: o “BIOPROS Extracts Library” que estão disponíveis para pesquisa de potenciais produtos naturais em alvos de interesse para a ciência no intuito de descobrir novos fármacos.

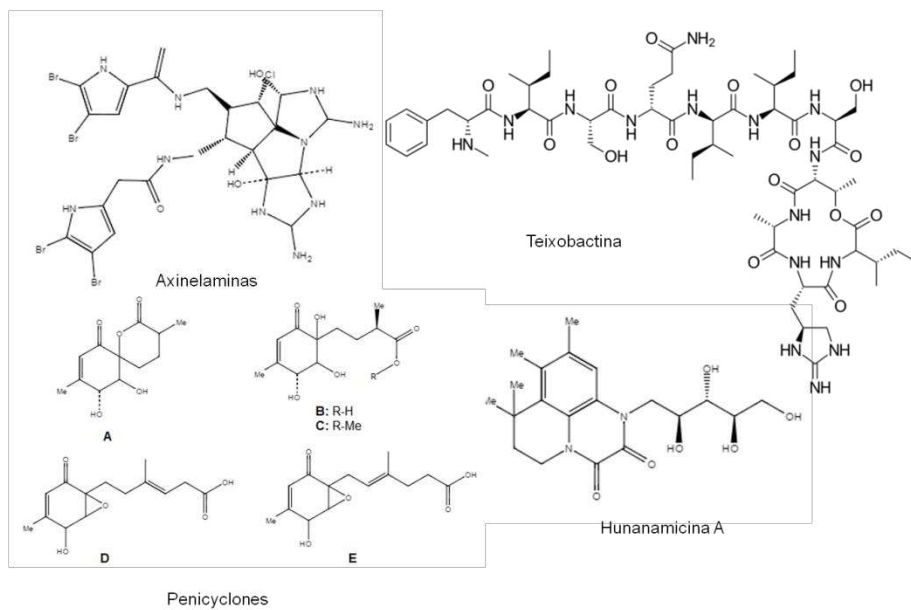


Figura 1: Alguns compostos antibacterianos derivados de produtos naturais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. BIODIVERSIDADE BRASILEIRA

Biodiversidade é a variabilidade entre organismos vivos de qualquer origem, incluindo a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas (BRASIL, 2000). O reconhecimento da importância dos recursos naturais utilizados pela conservação dessa diversidade genética tem sido colocado em pauta nos últimos anos, sendo assunto considerado estratégico para os países que a possui, trazendo a biodiversidade para o centro do desenvolvimento (PIMENTEL et al., 2015).

Sabe-se que a biodiversidade mundial está distante de ser explorada em sua totalidade. O Brasil, país considerado detentor da maior biodiversidade do planeta, contribui com apenas 1,5% do total da produção científica mundial no âmbito da diversidade biológica (CADETE et al., 2014; JOLY et al., 2014).

Segundo Lewinsohn e Prado (2006), o Brasil possui cerca de 13,2% de todas as espécies descritas pela ciência, porém, são poucas as espécies que possuem propriedades terapêuticas confirmadas por estudos científicos. Esse atraso compromete o aproveitamento sustentável da biodiversidade brasileira, o que pode ser atribuído ao complexo acesso a esses recursos (BRASIL, 2015).

Ao se falar da diversidade de espécies vegetais presentes no Brasil, destaca-se o bioma Mata Atlântica, que abriga uma diversidade de espécies de plantas por área superior ao da Floresta Amazônica (JOLY et al., 2014). Vários estudos científicos que avaliaram a diversidade florística da Mata Atlântica levaram à classificação desse bioma como estando entre os cinco principais *hotspots* de biodiversidade em nível mundial (MYERS et al., 2000).

Apesar de sua rica diversidade, o bioma Mata Atlântica é o segundo bioma mais ameaçado de extinção do planeta (RIBEIRO et al., 2011; EISENLOHR et al., 2013). Essa situação em que se encontra é decorrente principalmente das ações antrópicas, advindas dos ciclos econômicos da história de nosso país, como a exploração do pau-brasil, mineração e o ciclo do café e, recentemente, pela ocupação demográfica desordenada das áreas urbanas das grandes cidades. Hoje, as suas áreas remanescentes de

vegetação nativa estão reduzidas a cerca de 8% de sua cobertura original (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA e INPE, 2001).

É grande o apelo pela preservação da biodiversidade de forma sustentável. Essa preservação deve ser realizada de forma estratégica e requerendo competências científicas. Porém são poucos os estudos de abordagens ecológicas, fitossociológica e farmacológica relacionados ao bioma Mata Atlântica (TRIBESS et al., 2015).

A fixação de um novo marco regulatório, recentemente aprovado no Brasil, pretende incentivar a geração de valor sustentável a partir da biodiversidade brasileira. A Lei Nº 13.123, de 20 de maio de 2015, conhecida como a Lei da Biodiversidade, dispõe regras sobre o acesso ao patrimônio genético brasileiro, gerando maior proteção ao conhecimento tradicional associado e favorecendo a repartição justa dos benefícios gerados. A publicação dessa lei teve como um dos objetivos tornar mais acessível a pesquisa com espécies vegetais, avançando na gnose da biodiversidade (BRASIL, 2015).

2.2. ESTRATÉGIAS DE BIOPROSPECÇÃO

O desenvolvimento de pesquisas que visam o uso sustentável da biodiversidade pode assegurar uma pesquisa racional e objetiva de espécies vegetais com potencial bioativo e de interesse para a indústria farmacêutica (YADAV e MISHRA, 2013).

Para o acesso ao patrimônio genético, os bioprospectores podem utilizar diferentes estratégias para selecionarem as espécies vegetais a serem avaliadas quanto seu potencial farmacológico, como baseado em critérios etnofarmacológico, quimiosistemático, ecológico, computacional e randômico. Pela estratégia etnofarmacológica, o levantamento do conhecimento tradicional associado à biodiversidade direciona o estudo químico-farmacológico. Já pelo critério quimiosistemático, leva-se em consideração a quimiotaxonomia e filogenia de algumas famílias e gêneros reconhecidos por biossintetizarem determinadas classe de compostos químicos com atividade biológica. Na abordagem ecológica, a interação das espécies vegetais com o ambiente fornece informações para o direcionamento das pesquisas. Pode-se também

usar abordagem computacional, selecionando espécies baseadas em testes *in silico* da bioatividade dos compostos de determinadas espécies vegetais. Por último, tem-se a abordagem de acesso randômico, que consiste em recolher o material vegetal de forma aleatória, de acordo com a disponibilidade, para posteriormente realizar as triagens farmacológicas e fitoquímicas (ALBUQUERQUE et al., 2014; ATANASOV et al., 2015).

Segundo Khafagi e Dewedar (2000) em um estudo que analisou 36 espécies selecionadas randomicamente e 24 espécies colhidas a partir de informações etnobotânicas de plantas selvagens do Egito, a abordagem randômica levou à identificação de uma maior percentagem de espécies com forte atividade antibacteriana se comparado à abordagem etnobotânica, que identificou um maior número de plantas com atividade antibacteriana, porém menos eficazes.

Mesmo que, em alguns casos, a abordagem aleatória seja mais eficaz, não se podem excluir as informações etnobotânicas, pois as duas podem caminhar juntas na descoberta de novas drogas. Porém, encontrar um número pequeno de plantas que apresenta atividade pode ser mais relevante que encontrar um maior número de plantas com menor atividade (ALBUQUERQUE et al., 2014).

Desta forma, a abordagem aleatória vem demonstrando contribuições efetivas, pois, quanto maior a biodiversidade do material vegetal utilizado para testes biológicos, maior será a chance de encontrar novos compostos bioativos (PIETERS e VLIETINCK, 2005).

2.3. COLEÇÕES DE EXTRATOS VEGETAIS

Uma das formas de desenvolver estratégias de bioprospecção é a pesquisa com coleções de extratos oriundos de organismos vivos, como de espécies vegetais, pois delas obtém-se uma composição rica de metabólitos secundários, sendo um recurso promissor para descoberta de novos agentes bioativos (LOWELL et al., 2015; PERROS, 2015).

Em 1960, o Departamento de Produtos naturais do Instituto Nacional de Câncer (NCI), dos Estados Unidos, elaborou a primeira coleção de extratos utilizando a abordagem aleatória. Atualmente, essa coleção conta com mais de

230.000 amostras (MCCLLOUD, 2010), de onde importantes agentes clínicos como os taxanos e a camptotecina foram isolados (CRAGG e NEWMAN, 2005). Com o progresso de técnicas de rastreamento, as coleções de extratos do NCI passaram a incluir regiões tropicais e subtropicais do mundo, não se restringindo apenas a extratos vegetais, mas também a extratos de outros organismos, como microrganismos marinhos e fungos (CRAGG e NEWMAN, 2005).

As plantas utilizadas na Medicina Tradicional Chinesa também foram fonte para construção de uma biblioteca de extratos contendo cerca de 202 espécies vegetais. Idealizada e construída por pesquisadores da Escola Médica de Harvard, Universidade Chinesa de Medicina e Universidade Batista de Hong Kong, cada espécie foi qualificada segundo a farmacopeia chinesa, passando a servir como suporte para estudos científicos fundamentados na Medicina Tradicional Chinesa (EISENBERG et al., 2011).

O Brasil vem avançando na construção de “extratotecas” com a finalidade de bioprospecção. A exemplo, temos o Laboratório de Química de Produtos Naturais da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) de Belo Horizonte – Minas Gerais, que possui uma coleção *ex situ* com cerca de 4000 extratos de 1000 espécies. Esses extratos são utilizados para identificação de compostos ativos em potencial, para o desenvolvimento de novas drogas que contribuam com o tratamento de doenças negligenciadas, como a leishmaniose, doença de Chagas, malária e tuberculose (SIQUEIRA et al., 2007).

Outro exemplo de construção de coleções de extratos com a finalidade de bioprospecção farmacêutica no Brasil foi a realizada pelo grupo de pesquisadores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNICAMP, na qual algumas espécies vegetais do Cerrado e da Floresta Amazônica alimentam um acervo de extratos que foram estudados a fim de se encontrar espécies com potencial anticarcinogênico (CARVALHO, 2006).

Observa-se, assim, que a pesquisa de bioprospecção tem avançado com a possibilidade de construção de grandes coleções de extratos, como também com o implemento de novas técnicas de metabolômica que auxiliam na identificação química dos metabólitos secundários e na introdução do HTS (*High Throughput Screening*) para triagem da atividade biológica de moléculas em diferentes alvos, uma vez que, este método de experimentação científica

permite identificar rapidamente compostos ativos, fornecendo pontos de partida para o desenho de fármacos e para a compreensão da interação ou do papel de um processo bioquímico (HARVEY et al., 2015).

2.4. COLEÇÃO DE EXTRATO BIOPROS MATA ATLÂNTICA

Com o objetivo de explorar de forma sustentável as propriedades farmacológicas da Mata Atlântica, o grupo de pesquisa Bioprospecção Molecular no Uso Sustentável da Biodiversidade (BIOPROS), formado por uma rede de parceria entre pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e de outras instituições, construiu a primeira coleção de extratos informatizada oriunda de plantas nativas do bioma Mata Atlântica. O acervo do “BIOPROS Extracts Library” (BEL) é alimentado por extratos produzidos a partir de espécies vegetais acessadas em fragmentos de Mata Atlântica pertencentes à UFV, localizada na região da Zona da Mata Mineira (20°45'27,5"S e 42°51'38,7"W).

Essa coleção de extratos conta com o diferencial de ter uma interface com um sistema informatizado, a plataforma MAPA, que contém informações pertinentes sobre as espécies vegetais e coordenadas de georreferenciamento, que auxiliam no acesso ao patrimônio genético dessas espécies e na rastreabilidade dos extratos testados.

Em fase de construção desde 2013, a BEL foi construída da seguinte forma: das espécies arbóreas, foram coletadas folhas e galhos, e produziram-se quatro extratos diferentes de cada espécie, utilizando dois tipos de solventes, um orgânico (diclorometano e metanol 50:50) e o outro aquoso. O primeiro alvo biológico em que os extratos da BEL foram avaliados foi um estudo que avaliou a atividade citotóxica de 196 extratos frente a linhagens de células tumorais. De 49 espécies testadas, obtiveram-se sete espécies com atividade antitumoral, onde para uma delas não se tinha estudos científicos descritos em literatura (ALMEIDA, 2015).

Atualmente, cerca de 220 espécies arbóreas estão identificadas, georreferenciadas e seus dados adicionados à Plataforma MAPA. O acervo tem potencial de ter mais de 1000 extratos com diferentes composições químicas, que podem ser cedidos para a avaliação de outros potenciais

farmacológicos como antimicrobiano, antiviral, anti-helmíntico e inibidores de enzimas de interesse para a busca de novos fármacos (ALMEIDA, 2015).

2.5. PRODUTOS NATURAIS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os produtos naturais são utilizados na terapêutica desde os tempos mais remotos. Estes constituem cerca de mais de 40% dos fármacos para tratamento de infecções, câncer e colesterol, atuando também como analgésicos, antitérmicos e antimaláricos, a exemplo, penicilina, paclitaxel, lovastatina, morfina, ácido acetilsalicílico e artemisinina, respectivamente (Figura 2) (AWAN et al.,2016).

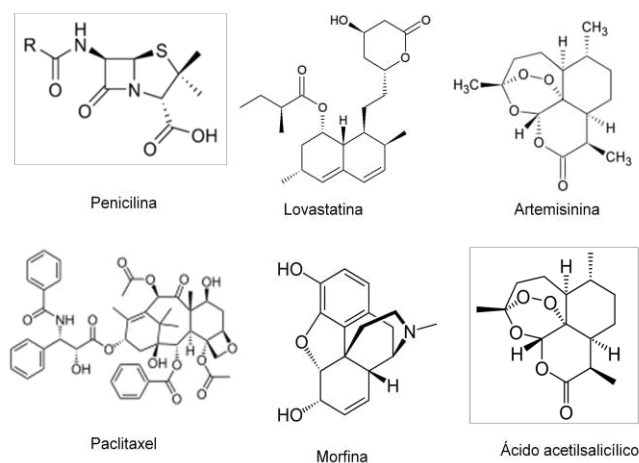


Figura 2: Medicamentos derivados de produtos naturais.

A classe dos antibióticos está intimamente ligada aos derivados de produtos naturais desde a descoberta da penicilina (Figura 2) produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, todavia, a partir de 1980 houve um vácuo na descoberta de antibacterianos (AWAN et al.,2016).

A resistência bacteriana se alastra mais rapidamente que a descoberta de novas moléculas. Somente após 30 anos da descoberta da daptomicina (Figura 3), última classe de antibacterianos aprovada para uso, é que se descobriu um novo composto, chamado de teixobactina. A teixobactina (Figura 1), produzida pela bactéria de solo, *Elephtheria terrae*, foi testada contra uma série de microrganismos patogênicos que não apresentaram resistência ao composto (LING et al., 2015; RAJA et al., 2003).

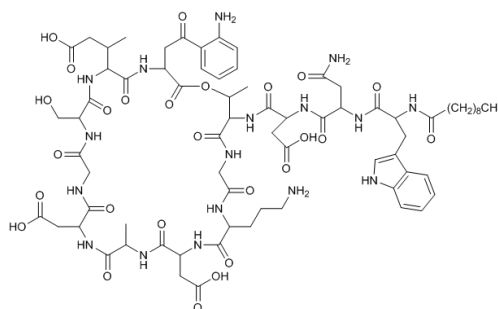


Figura 3: Estrutura química da Daptomina.

A busca por novas moléculas com atividade antibacteriana é primordial, sendo estratégica e promissora a investigação de produtos naturais por apresentarem grande diversidade estrutural, estereoquímica específica e interação com sítios ativos de proteínas (HARVEY et al., 2015).

As plantas são reconhecidas como fonte de estruturas químicas com elevado potencial terapêutico, destacando-se, a atividade antibacteriana contra bactérias clinicamente importantes (BORGES et al., 2015).

Segundo os cientistas, as plantas possuem uma imunidade inata frente a situações de estresse biótico e abiótico. O sistema imune adaptativo das plantas possuem proteínas sinalizadoras, tais como as proteínas de resistência a doenças (R). Quando ativas, frente a presença de patógenos por exemplo, as proteínas R desencadeiam uma rota de sinalização envolvida na biossíntese de metabólitos secundários (LEWIS e ASUBEL, 2006; JONES e DANGL, 2006).

Os metabólitos secundários, também conhecidos como produtos naturais, são compostos com estruturas químicas diversificadas, produzidos a partir dos metabólitos primários ou de seus intermediários, em reações frente a respostas aos estímulos ambientais (STROHL, 2000; LEITE, 2009). Observa-se que seu padrão de distribuição em plantas é determinado especificamente por cada família ou gênero, sugerindo uma evolução contínua das vias biossintéticas, fato este relevante ao considerarmos o avanço dos mecanismos de defesa das bactérias frente aos antibióticos (DIXON, 2001; WENG et al., 2012).

As plantas produzem mais de 100.000 moléculas, muitas das quais apresentam atividade antibacteriana (DIXON, 2001). Algumas dessas moléculas podem ser sistematizadas por classes de metabólitos secundários, como os fenólicos, quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas,

terpenoides e alcaloides (COWAN, 1999). Elas são classificadas em fitoanticipinas, moléculas presentes nas plantas na forma inativa, que se tornam ativas a partir do ataque bacteriano; ou fitoalexinas, moléculas cujos níveis aumentam fortemente em resposta à invasão bacteriana, podendo ser geradas também pela síntese *de novo*, após o acometimento da infecção (GONZÁLEZ et al., 2009).

O avanço nas pesquisas tem mostrado que os metabólitos secundários bioativos podem gerar novos medicamentos que combatem a resistência a multidrogas, além de atenuar a virulência e ajudar o sistema imune do hospedeiro a responder adequadamente ao patógeno invasor (GONZÁLEZ et al., 2009). Eles também podem inibir o crescimento ou levar à morte bacteriana, potencializar a atividade de antibióticos já conhecidos ou diminuir a adaptação do patógeno (MITCHELL et al., 2012).

Desta forma, existe uma necessidade de busca de novos agentes antimicrobianos que possam apresentar três importantes propriedades: especificidade, eficácia contra a bomba de multidrogas resistentes e diminuição os fatores de virulência (LEWIS e ASUBEL, 2006).

Para o tratamento das infecções bacterianas, vários estudos têm se dedicado a especificar a composição química dos compostos antimicrobianos de plantas e os mecanismos envolvidos na inibição do crescimento bacteriano, quer separadamente ou em sinergismo (SILVA e FERNANDES, 2010; WENG et al., 2012).

A combinação sinérgica entre a diversidade e complexidade dos compostos presentes em uma única espécie vegetal constitui um potente recurso para desenvolver um antibiótico de amplo espectro, capaz de inibir o crescimento de diferentes estirpes bacterianas (LEWIS e ASUBEL, 2006).

Alguns estudos têm mostrado que a natureza dos multicompostos encontrados nas plantas as tornam importantes fontes para a descoberta de novos fármacos para o tratamento de doenças complexas. Os mecanismos de ações de drogas vegetais em terapias sinérgicas demonstram que diferentes agentes podem regular um determinado alvo ou diferentes alvos por intermédio de diversas vias. Esse processo atua no metabolismo da droga no organismo, melhorando a biodisponibilidade, superando a maquinaria de resistência de células bacterianas, eliminando efeitos adversos e aumentando o potencial

farmacológico pelo processamento ou interação droga-droga (YANG et al., 2014).

Este arsenal de informações sobre o potencial antibiótico das plantas pode ser investigado utilizando estratégias de bioprospecção, a fim de explorar de forma sustentável a biodiversidade em busca de novos produtos naturais com valor econômico, social e ambiental agregado. Isso poderá ocorrer a partir do desenvolvimento de metodologias adequadas e eficientes a fim de obter ensaios biológicos consistentes, tanto para ação sinérgica dos metabólitos presentes quanto para isolamentos de produtos naturais bioativos (SIMÕES et al., 2009).

Atualmente, dentre as técnicas utilizadas para identificação dos produtos naturais ativos em extratos vegetais está o fracionamento biomonitorado, que consiste em separar os componentes químicos presentes em um extrato vegetal bioativo em diferentes frações, de forma que estas sejam novamente submetidas a ensaios biológicos, determinando, dessa forma, a fração mais ativa. Após a identificação e isolamento dos produtos naturais bioativos, são realizadas análises espectrométricas para a elucidação estrutural. Avalia-se também se a atividade biológica ocorre pela sinergia entre os compostos presentes no extrato ou se a atividade pode ser atribuída a um único composto químico (ATANASOV et al., 2015; NEWMAN, 2016).

Destacam-se alguns estudos de investigação de espécies vegetais com potencial antibiótico a fim de obter uma seleção de produtos naturais bioativos utilizando bibliotecas de extratos. Camargo (2014) testou cerca de 1791 extratos vegetais de espécies da Floresta Amazônica contra estirpes padrões de *Escherichia coli*, obtendo oito extratos ativos com potencial para ser usado como antibióticos de uso veterinário, ressaltando porém a importância da realização de análises complementares. Brighenti e colaboradores (2014) utilizaram 60 extratos de 10 espécies vegetais do Pantanal brasileiro, realizando um *screening* daqueles que possuíam atividade antibacteriana. Para isso, os extratos foram testados contra diferentes estirpes de bactérias, obtendo, ao final 47 extratos ativos contra pelo menos uma estirpe bacteriana.

Outro estudo utilizou espécies do bioma Caatinga, testando 23 extratos aquosos contra duas bactérias formadoras de biofilme, *Staphylococcus*

epidermidis e *Pseudomonas aeruginosa*, obtendo resultados promissores em três espécies vegetais testadas (SILVA et al., 2014).

Espécies vegetais da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica foram acessadas para estudo de bioprospecção e compõem o acervo da Universidade Paulista (UNIP), onde foram produzidos e testados 705 extratos orgânicos e aquosos em ensaios usando *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (SUFFREDINI et al., 2004). Após determinar a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima, apenas três extratos demonstraram-se bactericidas efetivos. Outros tiveram a atividade confirmada, mas, maiores estudos são necessários, visto que, dependendo da concentração, o extrato de algumas espécies mostrou-se ineficaz (SUFFREDINI et al., 2004).

2.6. RESISTÊNCIA BACTERIANA

As infecções causadas por bactérias patogênicas representam atualmente sério problema de saúde pública em diversos países, sendo responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade, bem como maiores custos no tratamento. Além disso, as atuais terapias com antibióticos, em alguns casos, não conseguem combater a enfermidade, devido à seleção de bactérias resistentes aos medicamentos (OOSTEN et al., 2015; YEDERY e JERSE, 2015; PERROS, 2015).

A amplitude do problema levou recentemente uma série de organizações internacionais, principalmente da Europa e Estados Unidos, a tomar medidas preventivas, levando ao público o conhecimento dos mecanismos de defesas das bactérias contra os antibióticos (LIN et al., 2015; EUROPA, 2015; EUA, 2014).

Estima-se que, na Europa, 25.000 pessoas morrem a cada ano como resultado de infecções causadas por bactérias multi-resistentes. Os prejuízos gerados aos cofres públicos chegam a €1.5 bilhões/ano. Nos Estados Unidos, mais de dois milhões de pessoas são infectados anualmente com bactérias resistentes, das quais 23.000 morrem (BLAIR et al., 2015).

Em novembro de 2015, ocorreu a primeira Semana de Conscientização Mundial do Antibiótico, promovida pela Organização Mundial de Saúde. Esta

campanha visou o uso racional dos antibióticos, bem como conscientizar a população da emergência e propagação de bactérias resistentes, objetivando melhores práticas, tanto do público em geral, quanto de profissionais da saúde e autoridades políticas, evitando o agravamento da situação (WHO, 2015).

A compreensão dos mecanismos pelos quais as bactérias se defendem do ataque de antibióticos pode ajudar a potencializar a ação desses fármacos, minimizando a sua resistência. Dentre estes mecanismos, destacam-se: os sistemas de efluxo, que são bombas situadas na membrana plasmática que expulsam compostos, como antibióticos, da célula bacteriana; genes responsáveis pela resistência, alguns desses genes fazem parte da unidade de DNA transposon que modificam o DNA bacteriano através de trocas de DNA cromossômico entre espécies com recombinação interespecífica conferindo resistência; reações enzimáticas que inativam antibióticos, como os β -lactâmicos e aminoglicosídeos, por hidrólise ou modificação estrutural; o sistema *Quorum sensing*, um sistema de comunicação inter e entre microorganismos, caracterizado pela liberação de sinais químicos que permite controlar processos celulares, como os genes de virulência e a formação do biofilme (BLAIR et al., 2015; LIN et al., 2015).

Com o avanço nas pesquisas, tem sido possível uma maior compreensão sobre a ecologia bacteriana, comprovando que as bactérias estão longe de serem células isoladas, e estabelecendo entre si, interações por um complexo sistema de sinalização (PENESYAN et al., 2015). Esta interação constitui o biofilme, em que as células bacterianas aderem a uma superfície. As células em biofilmes crescem como comunidades, rodeadas por uma espessa camada de substâncias poliméricas extracelulares provenientes da lise celular e de produtos de hidrólise das bactérias, constituídas de carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e vários heteropolímeros (MANNER et al., 2013). A presença dessas substâncias forma um escudo para as células protegendo-as do ataque de compostos químicos ou do estresse ambiental (PENESYAN et al., 2015).

O biofilme é constituído por subpopulações de células presentes em diferentes fases do crescimento bacteriano, apresentando em suas camadas mais internas células que estão metabolicamente inativas (MANNER et al., 2013). Todo esse arcabouço protege as células bacterianas, aumentando a

resistência aos antibióticos. Por exemplo, as bactérias que vivem nessas comunidades possuem um ganho de resistência aos antibióticos que pode ser de até 1000 vezes mais elevados do que as correspondentes células bacterianas individuais (PENESYAN et al., 2015). A resistência bacteriana aumentada devido à formação do biofilme está diretamente relacionada com doenças nosocomiais e dificulta o tratamento de diversas doenças sistêmicas de amplo público, como a cárie dentária, mastites, otite média, endocardite, feridas crônicas, osteomielite e outras (QUAVE et al., 2012).

A maioria das bactérias forma biofilmes, no entanto, muitos estudos que investigam a resistência a antibióticos e a busca por novos agentes antibacterianos têm direcionado suas pesquisas apenas para células bacterianas planctônicas, sendo ignorado o teste dessas moléculas sobre a comunidade bacteriana. Essa situação se repete também na indústria farmacêutica, mesmo sabendo que 80% de todas as infecções são levadas a complicações pela formação do biofilme (PENESYAN et al., 2015).

É importante ressaltar que os compostos antibiofilme atuam impedindo a sua formação ou causando a sua dispersão. Desta forma, possuem uma desvantagem inerente, pois não atuam sobre as células bacterianas que, por consequência, podem, ao retirar o composto ativo, restabelecer rapidamente o biofilme. Portanto, espera-se que a terapia combinada entre compostos antibiofilme e compostos que atuam na inibição do crescimento celular, dificultará a resistência bacteriana em doenças relacionadas ao biofilme (PENESYAN et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Bioprospectar produtos naturais antimicrobianos oriundos de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica.

3.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de extratos provenientes da “BIOPROS *Extracts Library*” (BEL);
- Avaliar a atividade antibiofilme dos extratos sem atividade antibacteriana;
- Obter o perfil cromatográfico dos extratos vegetais com atividade antibacteriana;
- Realizar a prospecção fitoquímica dos extratos vegetais com potencial atividade antibacteriana;
- Fracionar por biomonitoramento os extratos bioativos;
- Identificar os compostos presentes nas frações ativas;
- Estabelecer correlação da composição química com a atividade antibacteriana;
- Avaliar a ação bactericida e/ou bacteriostática;
- Avaliar a interação extrato e/ou fração e antibiótico para bactérias.

4. METODOLOGIA

4.1. AQUISIÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado foi previamente coletado em fragmento de Mata Atlântica da EPTEA Mata do Paraíso, sendo posteriormente direcionado para a extração com solventes químicos e estocados na coleção BEL (ALMEIDA, 2015).

As exsiccatas de todas as espécies do acervo da BEL foram depositadas no herbário VIC da UFV e no Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (PAMG/EPAMIG), em Belo Horizonte.

Para o presente trabalho, extratos dos galhos e das folhas do acervo da BEL foram empregados para a realização de uma triagem inicial para avaliação de atividade antibacteriana. A escolha dessas espécies para realização dos testes foi por um processo de amostragem aleatória (randômica).

4.2. ELABORAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Os extratos das folhas e dos galhos de espécies do acervo BEL foram obtidos pelo método de maceração com solventes de diferentes polaridades, descrito a seguir.

O material vegetal (folhas e galhos) recém-coletado foi submetido a secagem em estufa ventilada por 24 h à temperatura de 40°C (ALMEIDA, 2015). Após desidratado, o material vegetal foi pulverizado em moinho de facas. O material vegetal pulverizado de cada amostra foi inicialmente extraído com uma mistura de solventes diclorometano e metanol, na proporção de 1:1 (DCM: MeOH 1:1), colocado no percolado e mantido em repouso por aproximadamente 15 h. Após este intervalo, o extrato líquido foi drenado uma única vez e o solvente removido em evaporador rotatório para a obtenção do **extrato orgânico** (EO). A torta que permaneceu no percolador foi extraída posteriormente com 500 mL de água destilada, ficando em maceração por mais 15 h. Após esse período, o percolado foi novamente drenado, e a água retirada por meio do processo de liofilização para a obtenção do **extrato aquoso** (EA).

Após produção dos extratos secos, esses foram armazenados em frascos de penicilina, fechados e mantidos a -20°C protegidos da luz (MCCLOUD, 2010).

4.3. TESTES BIOLÓGICOS

Para realização dos testes biológicos, os extratos orgânicos e aquosos foram diluídos em dimetil sulfóxido (DMSO; Vetec®) na concentração de 50 mg/mL. A fim de facilitar a diluição, foram deixados em ultrassom por aproximadamente 20 min a 30°C. Posteriormente foram colocados a -20°C até a realização dos testes para verificação da atividade antibacteriana. Os testes biológicos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Molecular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV.

4.3.1. MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os microrganismos utilizados para a realização dos testes antibacterianos foram as estirpes Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Bacillus subtilis* ATCC 23857 e Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29853 e *Echerichia coli* ATCC 25922, que fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia Molecular. Nos ensaios de biofilme, utilizou-se a estirpe *Staphylococcus epidermidis* NRS101 ATCC 359883 obtidas da NARSA (*Network of Antimicrobial Resistance in Staphylococcus*), forte produtora de biofilme.

Os ensaios para a determinação da concentração inibitória mínima, da ação bactericida e/ou bacteriostática e da interação antibiótico/extrato foram realizados em caldo Mueller-Hinton (MH, Himedia®). Para os testes com biofilme foi utilizado caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Himedia®).

As bactérias foram estriadas em placas contendo BHI ágar (Kasvi®) um dia antes de cada experimento, mantidas a 37°C, e o inóculo ajustado para escala de 0,5 McFarland (10^8 UFC/mL).

4.3.2. ENSAIO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

A atividade antibacteriana procedeu segundo a técnica de difusão em ágar pelo método *holeplate*, conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI-2012). Para isso, 300 µL de uma suspensão contendo 10^6 UFC/mL foram misturados a 30 mL de meio ágar MH e vertido em placas de Petri. Furos de aproximadamente 5 mm de diâmetro e 3 mm de altura foram feitos no ágar, no qual foram adicionados 10 µL e 20 µL dos extratos a 50 mg/mL. Os controles foram feitos com 10 µL de DMSO e 10 µL de ampicilina (Sigma®, A9518) para *S. aureus* e 10 µL de gentamicina (Sigma®, G1264) para *P. aeruginosa* preparadas em uma concentração de 10 mg/mL. As placas foram mantidas a 37°C por 24 h e os halos de inibição medidos em milímetros. Os testes foram realizados em triplicata.

4.3.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Para os extratos que apresentaram atividade antibacteriana foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2012).

A coluna 1 das microplacas de 96 poços foi preenchida com caldo MH e extrato na concentração de 20 mg/mL, nos demais poços foram adicionados 100 µL do caldo MH. Posteriormente, realizou-se a diluição seriada utilizando pipeta multicanal, retirando 100 µL da coluna 1 e transferindo para coluna 2, homogeneizando 20 vezes. Esse processo foi repetido até a coluna 10, onde foram descartados 100 µL de solução.

A suspensão bacteriana a 0,5 da escala de McFarland foi feita e adicionada em caldo MH para concentração 10^6 UFC/mL. Em cada poço, foram colocados 100 µL da suspensão celular, fazendo com que a concentração do extrato caísse para a metade. Dessa forma, os extratos foram testados em concentrações que variam de 10 mg/mL até 0,003 mg/mL (Figura 4).

Para o controle do crescimento, 100 µL da mesma suspensão bacteriana foram adicionadas aos poços da coluna 11, que já continha 100 µL do caldo MH, acrescido de DMSO no volume correspondente à maior concentração de extrato testada. O controle negativo (coluna 12 e linhas A a D)

foi feito com 200 μL do caldo MH, e 200 μL do caldo MH acrescido com DMSO, no volume correspondente à maior concentração de extrato testada (coluna 12 e linhas E a H) (Figura 4).

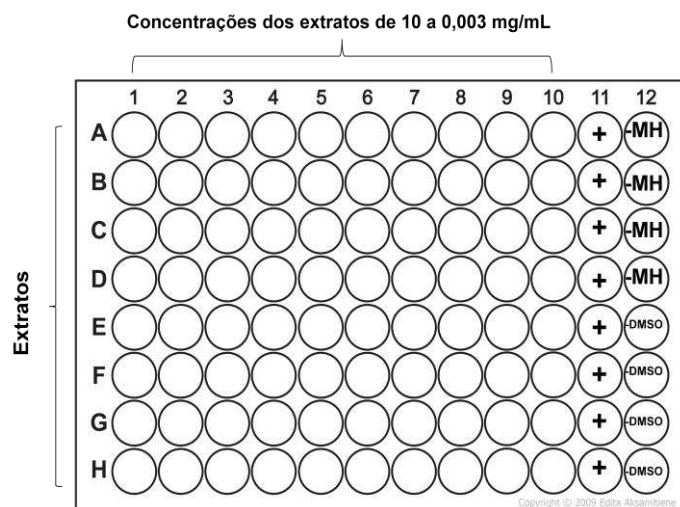


Figura 4: Distribuição das amostras para o teste de Concentração Inibitória Mínima.

***Legenda:** (+) controle positivo com 100 μL de MH e DMSO no volume correspondente à maior concentração de extrato testada e 100 μL da suspensão bacteriana; (-MH) controle negativo com 200 μL de caldo MH; (-DMSO) 200 μL de MH e DMSO no volume correspondente à maior concentração de extrato testada.

As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h. Posteriormente, o crescimento bacteriano foi averiguado com cloreto de *p*-iodonitrotetrazolio (INT, I8377, Sigma®) na concentração 2 mg/mL, onde 5 μL do reagente foram adicionados em cada poço deixando reagir por 2h a 37°C. Alteração da coloração do meio de amarelo para róseo-violeta foi utilizada como indicação de crescimento bacteriano.

A CIM foi definida como a menor concentração do extrato no qual visualmente não se observou coloração rosa. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.4. DETERMINAÇÃO DO EFEITO BACTERICIDA E/OU BACTERIOSTÁTICO

Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços mantidas a 37°C e preenchidas com o inóculo bacteriano a 10^6 UFC/mL, em meio líquido MH. Os extratos foram acrescentados no valor de CIM, 2X CIM e 4X CIM. A suspensão bacteriana na ausência dos extratos com atividade antimicrobiana foi utilizada como controle positivo. As amostras foram coletadas nos intervalos de tempo de 0, 2, 4, 6, 10 e 24 h e a UFC/mL determinada pelo método da microgota. Definiu-se como bacteriostático uma redução do inóculo original em até $<3 \log_{10}$ UFC/mL e como bactericida a menor concentração do extrato que reduziu o inóculo original em $>3 \log_{10}$ UFC/mL (MITCHELL et al., 2012).

4.3.5. INTERAÇÃO ENTRE ANTIBIÓTICOS E EXTRATOS

Para avaliar a interação dos extratos com os antibióticos, gentamicina, ampicilina e tetraciclina, empregou-se o método *checkerboard* (PALANIAPPAN e HOLLEY, 2010). Primeiramente foram distribuídos 100 μ L de caldo MH em cada poço da placa de 96 poços. Posteriormente, 100 μ L de caldo MH e antibiótico foi adicionado no eixo das ordenadas na primeira linha da placa para que se obtenha concentração igual a 8X a CIM e realizada então a diluição seriada na vertical (Figura 5). O extrato foi adicionado na primeira coluna das abscissas da placa de 96 poços juntamente com 100 μ L de caldo MH para que se obtenha uma concentração de 4X a CIM e então foi realizada a diluição seriada na horizontal (Figura 6).

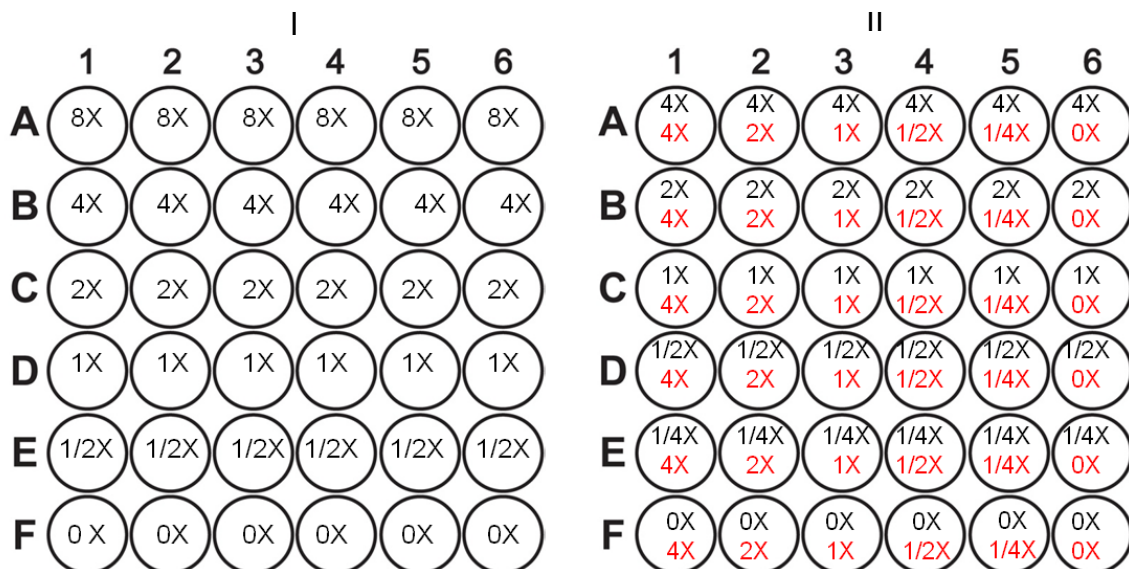


Figura 5: Esquema da diluição seriada dos antibióticos e dos extratos para determinação do tipo de interação entre eles.

*Legenda: antibióticos (I) e extratos em vermelho e antibiótico após adição dos extratos em preto (II).

Um volume de 100 µL de suspensão bacteriana correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland foi adicionado a cada poço da microplaca de 96 poços, e as placas foram incubadas por 24 h a 37°C.

Após as diluições e adição do inóculo, o extrato e o antibiótico ficaram distribuídos nos poços em concentrações que variam de 2X a 1/8X da CIM (Figura 3).

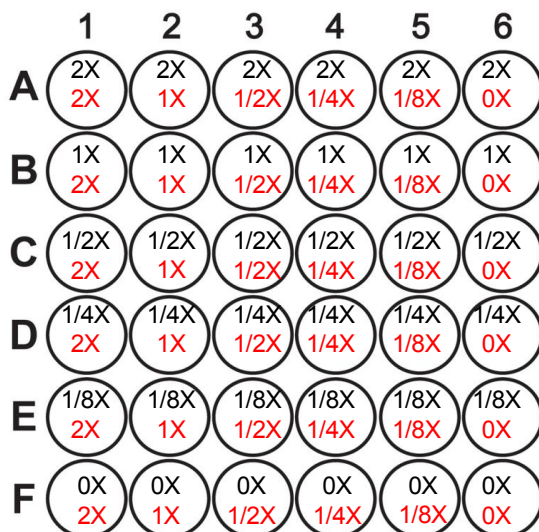


Figura 6: Esquema das concentrações finais do extrato e do antibiótico para determinação do tipo de interação entre eles.

*Legenda: concentração do extrato em vermelho e do antibiótico em preto.

A avaliação do crescimento bacteriano foi feita visualmente utilizando 5 µL de INT nos poços, e incubando a placa a 37°C por 2 h.

O efeito das combinações foi avaliado pelo cálculo do índice FIC (Concentração Inibitória Fracionária) para cada combinação usando as fórmulas abaixo. As combinações foram consideradas sinérgicas quando o índice FIC ≤ 0,5 (PALANIAPPAN e HOLLEY, 2010).

$$\text{FIC (antibiótico)} = \frac{\text{CIM (antibiótico) em combinação}}{\text{CIM (antibiótico) sozinho}}$$

$$\text{FIC (extrato)} = \frac{\text{CIM (extrato) em combinação}}{\text{CIM (extrato) sozinho}}$$

$$\text{Índice FIC} = \Sigma \text{FIC} = \text{FIC (antibiótico)} + \text{FIC (extrato)}$$

4.3.6. ATIVIDADE DOS EXTRATOS SOBRE BIOFILMES EM FORMAÇÃO E PRÉ-FORMADOS

A ação antibiofilme dos extratos foi avaliada naqueles que não apresentaram atividade antibacteriana (KLEIN, 2014). Para isto, uma suspensão de células (100 µL) ajustada para 0,5 na escala de McFarland foi adicionada a cada poço juntamente com caldo BHI (Himedia®) glicosado (BHlg) para um volume final de 200 µL. Após incubação por 24 h em estufa a 37°C, as células planctônicas foram removidas por lavagem e às células do biofilme formado adicionou-se BHlg suplementado ou não com os extratos na concentração de 2 mg/mL. Após 6 h, as placas foram delicadamente lavadas três vezes com PBS (pH 7,8), seguido de coloração com cristal violeta 0,1% por 30 min e de adição de álcool 95% por 45 min. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 560 nanômetros (VersaMax ELISA Microplate Reader). O biofilme incubado somente com BHlg foi utilizado como controle. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

Para avaliar a atividade dos extratos sobre o biofilme em formação, os experimentos foram realizados como descrito acima, porém adicionando-se a cultura com os extratos vegetais, e permitindo o crescimento por 24 h antes da

coloração com cristal violeta. Os experimentos também foram conduzidos em triplicata.

Foi avaliado o quanto os extratos interferiam na estrutura deste biofilme pelos cálculos abaixo:

$$\text{Formação do biofilme (\%)} = \frac{\text{absorbância em 560nm do extrato}}{\text{absorbância em 560nm do controle positivo}} \times 100$$

$$\text{Inibição do biofilme (\%)} = 100 - \text{formação do biofilme}$$

4.4. ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS ATIVOS

O fracionamento biomonitorado e as análises fitoquímicas, executado no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV, foi realizado para o extrato selecionado na triagem inicial, levando em consideração o potencial antimicrobiano de amplo espectro evidenciado pelos testes biológicos, associado à carência de estudos químicos e farmacológicos para a espécie vegetal. Assim, o estudo fitoquímico foi empregado para monitorar quimicamente o fracionamento.

4.4.1. FRACIONAMENTO BIOMONITORADO

Para o fracionamento biomonitorado foi empregado o método de partição líquido-líquido (PLL). Para essa partição, uma fração de 1 g de extrato foi inicialmente ressuspensa em 100 mL de água ultra-pura, filtrada em sistema Milli-Q, com auxílio de banho ultrassônico a 30°C por 10 min. Essa suspensão foi então transferida para funil de separação, iniciando a partição com uma sequência de solventes com polaridade crescente, começando com hexano (Sigma®), diclorometano (Sigma®), acetato de etila (Sigma®) e butanol (Sigma®). Cerca de 100 mL de cada solvente foram usados na partição, sendo cada processo realizado com mais duas repetições. Ao término de cada partição, a fase orgânica foi separada e concentrada em rotavapor para se obter o extrato seco, sendo a fase aquosa levada a secagem pelo processo de liofilização.

Para verificar o rendimento, cada fração foi pesada após secagem e o monitoramento foi realizado por prospecção fitoquímica em cromatografia em camada delgada (CCD) e pelo perfil fitoquímico obtido pela cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (MESSIAS et al., 2008).

4.4.2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Utilizaram-se cromatofolhas em alumínio (com indicador fluorescente 254 nm, Sigma®) nos tamanhos 10 cm de altura e 5 cm de largura e 10 cm de altura por 10 cm de largura, que foram ativadas em estufa a 50°C por 10 min antes e depois da aplicação das amostras com auxílio do capilar de vidro. A fase móvel sugerida foi diclorometano, acetato de etila, ácido fórmico (80:15:5) e/ou acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético, água (78:5:5:12). Os padrões fitoquímicos das diferentes classes de produtos naturais pesquisados, bem como os respectivos agentes reveladores, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Metabólitos secundários investigados no extrato ativo, padrões e reveladores utilizados na prospecção fitoquímica.

Metabólito secundário	Padrão	Reagente Revelador
Fenólicos	Ácido pirogálico	Reagente de Barton
Flavonoídes	Rutina	NP/PEG
Saponinas	Ácido 18-β-glicirretínico	Anisaldeído sulfúrico
Cumarinas	Venalot®	Hidróxido de potássio 5%
Antraquinona	1,8-diidroxiantraquinona	Hidróxido de potássio 5%
Triterpenos/esteroides	β-sitosterol	Reagente de Lieberman-Burchard
Alcaloides	Quinina	Reagente de Dragendorff
Óleos essenciais	-	Anisaldeído sulfúrico

4.4.3. MONITORAMENTO POR HPLC-DAD DO FRACIONAMENTO BIOMONITORADO

O extrato bruto e as frações obtidas após a PLL foram monitoradas quimicamente pelos seus perfis fitoquímicos, empregando a técnica HPLC-DAD.

Os perfis fitoquímicos do extrato ativo e suas frações foram determinados por HPLC Shimadzu, com detector DAD Shimadzu Prominence, bomba LC - 20 AD, detector SPD - M 20 A, forno CTO - 20 A e software LabSolutions. A coluna utilizada nas eluições foi de fase reversa (C-18) (Shimpack[®], 250 mm x 4,6 mm).

O preparo das amostras foi realizado utilizando 5 mg das mesmas solubilizadas em 1 mL de metanol grau HPLC (Sigma[®]) com auxílio de banho ultrassônico em temperatura de 30°C por 30 min. Posteriormente, as amostras foram filtradas em filtro de seringa milipore de 45 µm, acondicionadas nos vials e levadas ao HPLC.

Para a fase móvel, empregou-se sistema binário em gradiente linear (Tabela 2), com Fase A: H₂O ultrapura/ácido acético 2% (v/v) e Fase B: metanol grau HPLC. O gradiente iniciou com 0% de B até 95% B após 62 minutos. Em seguida, aumento-se o fluxo de 1 mL/min para 1,2 mL/min para a lavagem da coluna, o sistema então voltou à concentração inicial (5% B) após 15 minutos.

Tabela 2: Gradiente de eluição empregado na análise dos extratos e frações por HPLC-DAD.

Tempo (min)	Fase B: Metanol (%)	Fase A: H ₂ O/ ácido acético 2% (v/v)(%)
0	0	100
50	50	50
60	60	40
62	95	5

4.4.4. IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA POR UPLC-UV-MS DE COMPOSTOS ATIVOS PRESENTES NA FRAÇÃO ATIVA

As análises foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo Prof. Dr. Geraldo Célio. Foi utilizado o sistema Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) ACQUITY da Waters, detecção DAD e Espectrômetro de massas (MS). Utilizou-se uma coluna CSH130 C18 (partículas de 1.7 μm , 50 x 3 mm d.i.), detecção UV 220-400 nm, fluxo de 0,3 mL/min e manteve-se o forno da coluna a 40°C. Empregou-se um gradiente de acetonitrila (MeCN) 0,1% Ac. Fórmico - H₂O 0,1% ácido fórmico, compreendendo um período de eluição gradiente linear longo (5 – 95% de MeCN, em 10 min), mantendo-se, a seguir, um curto período de eluição isocrática (95% de MeCN por 1 min) (Tabela 3).

Na obtenção dos espectros de massas, empregou o sistema de ionização por *electron spray* (ESI), voltagem do capilar 3,5 V; voltagem do cone 60 V. Foram empregados solventes grau HPLC (Tedia Brasil[®]) e água destilada, filtrada em sistema Milli-Q. A partir das informações obtidas nos espectros de massa e nos cromatogramas de absorção no ultra-violeta (UV), comparados com dados da literatura, foram propostas as estruturas químicas para as substâncias presentes no extrato com maior atividade biológica.

Tabela 3: Gradiente de eluição empregado nas análises dos extratos e frações por UPLC.

Tempo (min)	H ₂ O 0,1% ácido fórmico	MeCN 0,1% ácido fórmico
0	95	5
10	5	95
11	5	95
13	95	5

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TRIAGEM PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS FRENTE A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Foi avaliada a atividade antibacteriana de 96 extratos feitos a partir de galhos e folhas de 24 espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica, existentes no acervo da BIOPROS *Extracts Library*. Os extratos foram selecionados de forma aleatória e testados na concentração de 50 mg/mL contra bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e Gram-negativa *Pseudomona saeruginosa* ATCC 27853 pelo teste de difusão em ágar, considerando como atividade antibacteriana a formação de um halo cujo diâmetro foi registrado em mm.

Dos extratos testados, 36 apresentaram halos de inibição frente *Staphylococcus aureus* e sete frente a *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 4).

Tabela 4: Triagem preliminar da atividade antibacteriana de 96 extratos da BIOPROS *Extracts Library* pelo teste de difusão em ágar. Os resultados estão expressos pelo diâmetro dos halos (mm).

Família	Espécie	Voucher	Parte Planta	<i>Staphylococcus aureus</i> ^a ATCC 29213				<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^a ATCC 27853			
				EO ^b		EA ^b		EO ^b		EA ^b	
				10	20	10	20	10	20	10	20
Anacardiaceae	<i>Schinus terebintifolius</i> Raddi	VIC40.349	Folha	11,2	13,6	10,3	12	14,3	16	13	15,3
			Galho	10,5	12,6	7,5	9	11	13,6	6,3	9
Annonaceae	<i>Guatteria australis</i> A. S.-Hil.	VIC40.511	Folha	0	0	0	0	0	0	0	0
			Galho	0	0	0	0	0	0	0	0
Asteraceae	<i>Vernonanthura discolor</i> (Spreng.) H. Rob.	VIC40.381	Folha	0	0	0	0	0	0	0	0
			Galho	0	0	0	0	0	0	0	0
Asteraceae	<i>Vernonanthura phosphoric</i> (Vell.) H. Rob.	VIC40.383	Folha	0	0	0	0	0	0	0	0
			Galho	0	0	0	0	0	0	0	0
Bignoniaceae	<i>Cybistax antisiphilitica</i> (Mart.) Mart.	VIC40.528	Folha	0	0	0	0	0	0	0	0
			Galho	0	0	0	0	0	0	0	0
Cannabaceae	<i>Trema micrantha</i> (L.) Blume	VIC40.364	Folha	0	6	0	5,6	0	0	0	0
			Galho	7,6	9,3	8,6	11	0	0	0	0
Celastraceae	<i>Maytenus aquifolia</i> Mart.	VIC40.427	Folha	0	0	0	0	0	0	0	0
			Galho	7,6	9,6	0	0	0	0	0	0
Euphorbiaceae	<i>Aparisthium cordatum</i> (A. Juss.) Baill.	VIC40.483	Folha	8,6	10	9,6	11,3	0	0	0	0
			Galho	6,5	8,6	0	0	0	0	0	0
Euphorbiaceae	<i>Croton celtidifolius</i> Baill.	VIC40.568	Folha	0	0	0	0	0	0	0	0
			Galho	0	0	0	0	0	0	0	0
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum citrifolium</i> A. S.-Hil.	VIC40.612	Folha	0	0	0	0	0	0	0	0
			Galho	8,3	10,3	8,1	9,6	0	0	0	0
Fabaceae	<i>Inga cylindrica</i> (Vell.) Mart.	VIC40.209	Folha	0	0	0	0	0	0	0	0
			Galho	0	0	0	0	0	0	0	0
Lamiaceae	<i>Aegiphilla integrifolia</i> (Jacq.) Moldenke.	VIC40.539	Folha	0	0	0	0	0	0	0	0
			Galho	0	0	0	0	0	0	0	0
Lauraceae	<i>Endlicheria paniculata</i> (Spreng.) J. F. Mac.	VIC40.253	Folha	0	0	0	0	0	0	0	0
			Galho	0	0	0	0	0	0	0	0
Lauraceae	<i>Nectandra oppositifolia</i> Nees & Mart.	VIC40.227	Folha	9,6	11,6	8	9	0	0	0	0
			Galho	7,3	9,6	7	9,3	0	0	0	0
Melastomatacea	<i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin.	VIC40.396	Folha	13,8	16	0	0	10,6	14,3	0	0
			Galho	0	0	0	0	0	0	0	0
Moraceae	<i>Clarisia ilicifolia</i> (Spreng.) L. & Rossberg.	VIC40.265	Folha	0	0	0	0	0	0	0	0
			Galho	0	0	0	0	0	0	0	0
Myrtaceae	<i>Eugenia florida</i> DC.	VIC40.304	Folha	7	8,3	8,6	10,6	0	0	0	0
			Galho	10	11,6	6,5	9	8	11	0	0
Myrtaceae	<i>Marlierea teuscheriana</i> (O. Berg) D. Legrand.	VIC40.300	Folha	9,6	11	10,7	12	0	0	0	0
			Galho	10,3	11,3	10,7	12	0	0	0	0
Myrtaceae	<i>Syzygium jambos</i> (L.) Alston.	VIC40.312	Folha	0	0	13,3	14,3	0	0	0	0
			Galho	7,6	11	6,3	9,6	0	0	0	0
Primulaceae	<i>Myrsine coriacea</i> (Sw.) R. Br. ex R. & Schult.	VIC40.421	Folha	8,1	10,6	0	6	0	0	0	0
			Galho	0	6	5,5	7	0	0	0	0
Salicaceae	<i>Casearia decandra</i> Jacq.	VIC40.392	Folha	0	0	9	11,6	0	0	0	0
			Galho	0	0	0	0	0	0	0	0
Solanaceae	<i>Acnistus arborescens</i> (L.) Schldl.	VIC40.327	Folha	0	0	0	0	0	0	0	0
			Galho	0	0	0	0	0	0	6,6	7,6
Solanaceae	<i>Aureliana velutina</i> Sendtn.	VIC40.313	Folha	7,8	11	0	0	0	0	0	0
			Galho	0	0	0	0	0	0	0	0
Verbenaceae	<i>Aloysia virgata</i> (Ruiz & Pav.) Juss.	VIC40.582	Folha	0	0	0	0	0	0	0	0
			Galho	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Os halos de inibição registrados representam a média de três repetições.

^b Os extratos orgânicos (EO) e aquoso (EA) de diferentes partes da planta (folhas e galhos) foram aplicados nos poços em diferentes volumes (10µL e 20µL). Solvente orgânico: Diclorometano/Metanol (1:1). Solvente aquoso: água destilada.

***Legenda:** espécies com atividade antibacteriana (vermelho) e espécies sem atividade (preto).

As espécies *Schinus terebintifolius*, *Trema micrantha*, *Maytenus aquifolia*, *Aparisthmium cordatum*, *Erythroxylum citrifolium*, *Nectandra oppositifolia*, *Miconia latecrenata*, *Eugenia florida*, *Marlierea teuscheriana*, *Syzygium jambos*, *Myrsine coriacea*, *Casearia decandra*, *Acnistus arborescens* e *Aureliana velutina* inibiram o crescimento de pelo menos uma das estirpes bacterianas testadas. Essas espécies estão distribuídas em um total de 11 diferentes famílias botânicas, sendo que três espécies pertencem à família Myrtaceae e duas à Solanaceae. Esse resultado é bastante promissor, pois 14 espécies das 24 testadas mostraram atividade na triagem inicial, o que equivale a uma porcentagem de acerto de 58,3%. Analisando os extratos, 37 de um total de 96 testados levaram à formação de halos de inibição, revelando uma ação antibacteriana.

As espécies *Schinus terebintifolius*, *Miconia latecrenata* e *Eugenia florida* apresentaram atividade antibacteriana tanto para Gram-positiva, quanto para Gram-negativa. Halos de inibição foram vistos em todos os extratos da espécie *Schinus terebintifolius* independente da estirpe bacteriana.

Das espécies que apresentaram atividade antibacteriana, muitas já haviam sido descritas na literatura, e continuam a ser alvo de estudos, inclusive com compostos químicos isolados dos extratos brutos, como é o caso de *Schinus terebintifolius*, *Aparisthmium cordatum*, *Eugenia florida*, *Myrsine coriacea*, *Syzygium jambos* e *Acnistus arborescens* (DOS SANTOS et al., 2015; SOUZA et al., 2013; BASTOS et al., 2013; BURGUER et al., 2015; HAQUE et al., 2015; CHATTERJEE e CHAKRABORTI, 1980).

Espécies como *Maytenus aquifolia*, *Erythroxylum citrifolium*, *Nectandra oppositifolia*, *Miconia latecrenata* e *Casearia decandra*, não tiveram até o momento potencial antibiótico descrito, embora várias espécies do gênero tenham comprovada ação contra bactérias patogênicas (MOTERIYA et al., 2014; SANTOS, 2011; MACÍAS et al., 2015; RODRIGUES et al., 2008; SILVA et al., 2008).

As espécies *Aureliana velutina* e *Marlierea teuscheriana* não possuem registros na literatura quanto ao seu potencial antibacteriano, no entanto, as famílias a qual pertencem possuem produtos naturais com atividade antibacteriana confirmada (HUSSAIN et al., 2015; CHAVEZ et al., 2016). Quanto à espécie *Trema micrantha* não há registros na literatura de sua ação

antibacteriana, nem mesmo para outras espécies do gênero, sendo, portanto, este o primeiro relato de sua atividade sobre *S. aureus*.

5.2. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS EXTRATOS ATIVOS

A CIM foi determinada para todos os extratos para os quais houve formação de halo de inibição na triagem inicial (Tabela 5). Observou-se que para bactéria Gram-positiva a CIM dos extratos testados foi menor do que para a Gram-negativa, a menor concentração observada para *S. aureus* foi de 0,31 mg/mL enquanto que para *P. aeruginosa* foi 2,5 mg/mL. Os extratos de algumas plantas foram seletivos para uma estirpe bacteriana e com baixo valor de CIM, como foi o caso de *Maytenus aquifolia*, *Aparisthmium cordatum*, *Marlierea teuscheriana*, *Syzygium jambos*, *Casearia decandra* e *Aureliana velutina*.

Tabela 5: Concentração inibitória mínima (CIM), em mg/mL, dos extratos ativos.

Família	Espécie	Voucher	Parte Planta	<i>Staphylococcus aureus</i> ^a ATCC 29213		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^a ATCC 27853	
				EO ^b	EA ^b	EO ^b	EA ^b
Anacardiaceae	<i>Schinus terebintifolius</i> Raddi.	VIC40.349	Folha	0,31	0,31	2,5	2,5
			Galho	1,25	2,5	5	5
Cannabaceae	<i>Trema micrantha</i> (L.) Blume.	VIC40.364	Folha	2,5	2,5	- ^c	-
			Galho	2,5	1,25	-	-
Celastraceae	<i>Maytenus aquifolia</i> Mart.	VIC40.427	Galho	0,31	-	-	-
Euphorbiaceae	<i>Aparisthmium cordatum</i> (A. Juss.) Baill.	VIC40.483	Folha	0,31	0,31	-	-
			Galho	0,62	-	-	-
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum citrifolium</i> A. S.-Hil.	VIC40.612	Galho	1,25	2,5	-	-
Lauraceae	<i>Nectandra oppositifolia</i> Nees & Mart.	VIC40.227	Folha	1,25	1,25	-	-
			Galho	1,25	2,5	-	-
Melastomatacea	<i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin.	VIC40.396	Folha	0,31	-	2,5	-
Myrtaceae	<i>Eugenia florida</i> DC.	VIC40.304	Folha	1,25	1,25	-	-
			Galho	1,25	1,25	5	-
Myrtaceae	<i>Marlierea teuscheriana</i> (O. Berg) D. Legrand.	VIC40.300	Folha	1,25	0,31	-	-
			Galho	0,31	1,25	-	-
Myrtaceae	<i>Syzygium jambos</i> (L.) Alston.	VIC40.312	Folha	-	0,31	-	-
			Galho	1,25	1,25	-	-
Primulaceae	<i>Myrsine coriacea</i> (Sw.) R. Br. ex R. & Schult.	VIC40.421	Folha	0,62	10	-	-
			Galho	2,5	2,5	-	-
Salicaceae	<i>Casearia decandra</i> Jacq.	VIC40.392	Folha	-	0,31	-	-
Solanaceae	<i>Acnistus arborescens</i> (L.) Schldl.	VIC40.327	Galho	-	-	-	>10
Solanaceae	<i>Aureliana velutina</i> Sendtn.	VIC40.313	Folha	0,31	-	-	-

^a Os valores apresentados representam uma média de três repetições.

^b Extratos das folhas e galhos, orgânico (EO) e aquoso (EA). Solvente orgânico: Diclorometano/Metanol (1:1). Solvente aquoso: água destilada.

^c Os traços representam os extratos que não se determinou a CIM pois não apresentaram atividade..

A classificação adotada por Aligianis e colaboradores (2001) define como forte inibição um valor de CIM até 0,5 mg/mL; inibição moderada um valor entre 0,6 e 1,5 mg/mL e fraca inibição um valor de CIM acima de 1,6 mg/mL. Segundo a classificação, obteve-se 11 extratos com forte inibição, 16 extratos com inibição moderada e 9 extratos com fraca inibição para *S.aureus*. Para *P.aeruginosa* todos apresentaram fraca inibição.

Todos os extratos de *S. terebintifolius* apresentaram atividade, com CIM menor que 5 mg/mL, contra as duas bactérias testadas. Isso indica que a(s) molécula(s) responsável(is) por esta atividade está distribuída em diferentes partes da planta e são extraídas por solventes com diferentes polaridades.

Três espécies vegetais apresentaram atividade antibacteriana para ambas as estirpes testadas (*Schinus terebintifolius*, *Miconia latecrenata*, *Eugenia florida*) e, desta forma, possuem potencial para o desenvolvimento de um antibiótico de amplo espectro. Porém, pouco se conhece sobre a atividade antibacteriana da espécie *Miconia latecrenata*, o que reforça a necessidade de mais estudos de seu potencial antibiótico e dos metabólitos responsáveis por sua atividade. A CIM do EO de folhas de *Miconia latecrenata* foi de 0,31 mg/mL e 2,5 mg/mL para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente.

De acordo com os resultados mostrados tanto no teste de difusão quanto na determinação da CIM pode-se observar que as bactérias Gram-negativas possuem uma susceptibilidade menor aos extratos. A morfologia celular das bactérias Gram-negativas pode ser a responsável por essa diferença, uma vez que essas bactérias possuem uma membrana externa que proporciona uma barreira mecânica, sem afetar a troca de nutrientes e a seletividade para sua sobrevivência (HUWAITAT et al., 2016; SILVER, 2016). Essa membrana retarda a passagem de moléculas hidrofóbicas devido à presença dos lipopolissacarídeos e também impede a difusão de moléculas hidrofílicas. A contínua alteração da composição lipídica ou protéica da membrana externa leva à resistência aos fármacos, causando o aumento da hidrofobicidade da membrana externa, alteração da especificidade da porosidade e a eficácia das bombas de efluxo (HUWAITAT et al., 2016; SILVER, 2016). Por essas razões existe uma maior dificuldade em encontrar compostos que atuem contra as bactérias Gram-negativas, tornando relevante

a descoberta de compostos que consigam burlar esses mecanismos de resistência.

5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DOS EXTRATOS SEM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os 64 extratos que não apresentaram atividade antibacteriana para *S. aureus* pelo teste de difusão em ágar (Tabela 4) foram utilizados para avaliação da atividade antibiofilme em *Staphylococcus epidermidis* NRS101 ATCC 359883, uma estirpe forte produtora de biofilme. Uma triagem inicial do efeito dos extratos sobre a formação de biofilme foi feita na concentração de 1 mg/mL e aqueles extratos que conseguiram reduzir a formação do biofilme em 20% foram testados novamente em concentrações que variaram de 2 a 10 mg/mL (Figura 7). Pode-se observar, em alguns casos, que quanto maior a concentração do extrato usada, maior foi a interação do mesmo com o cristal violeta, o que ocasionou em aumento da absorbância. Isso mostrou uma interferência da constituição química do extrato no ensaio de biofilme.

Pelas razões expostas acima, realizou-se um teste preliminar, empregando três diferentes extratos e avaliando o efeito da interferência na leitura da absorbância correlacionado a concentração desses extratos. A execução desse teste utilizando apenas três extratos foi devido à inviabilidade de realizar com todos os 64 extratos, tanto pela quantidade de extratos consumidos para fazer os testes em diferentes concentrações quanto pelo número elevado de extratos a serem testados. Dessa forma, selecionou-se a concentração de 2 mg/mL para os ensaios posteriores uma vez que a interferência não foi observada (Figura 7).

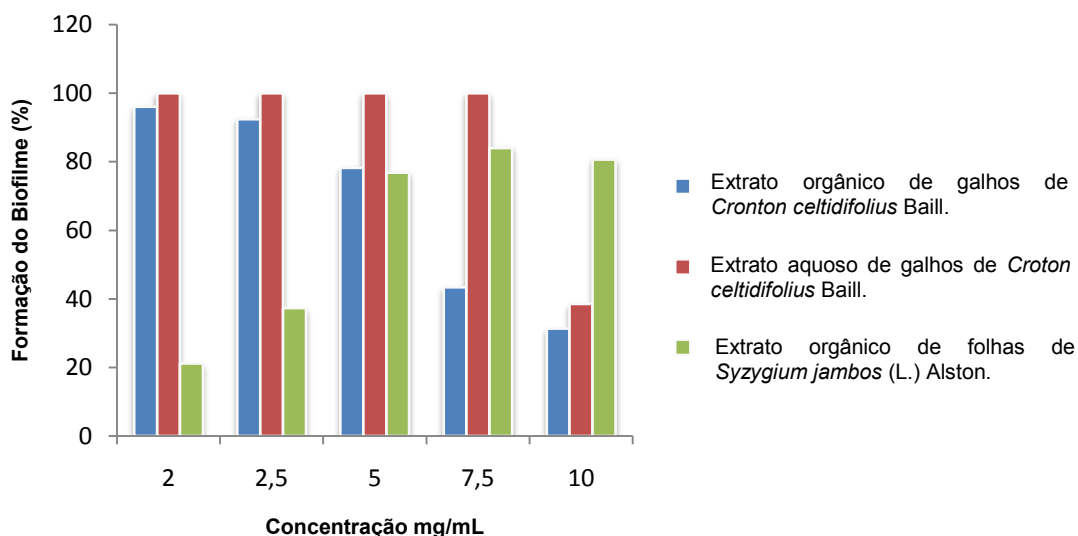


Figura 7: Relação da interferência entre diferentes concentrações de três extratos vegetais e a coloração resultante da interação desses com o revelador cristal violeta no teste de formação do biofilme em *Staphylococcus epidermidis* NRS101 ATCC 359883.

Conforme demonstrado na Tabela 6, nenhum extrato conseguiu reduzir significativamente o biofilme pré-formado de *S. epidermidis*. O EA de galhos de *Maytenus aquifolia* foi o extrato que apresentou maior interferência, no qual, de 100% de formação caiu para 89%, dessa forma, a ação do extrato reduziu em 11%. Avaliou-se também a inibição da formação do biofilme pelos extratos (Tabela 7), e observaram-se resultados promissores para o EO de folhas de *Syzygium jambos* e os EO de folhas e galhos de *Inga cylindrica* uma vez que foi detectada a formação do biofilme em 21,13%; 35,55% e 44,38%, respectivamente, inibindo o biofilme em 78,87%; 64,45% e 55,62%, respectivamente.

Tabela 6: Atividade de extratos vegetais sobre biofilme pré-formado de *Staphylococcus epidermidis* NRS101 ATCC 359883.

Família	Espécie	Voucher	Parte Planta	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NRS101 ATCC359883 ^a	
				EO ^b	EA ^b
Annonaceae	<i>Guatteria australis</i> A. S.-Hil.	VIC40.511	Folha	100	100
			Galho	96,06	100
Asteraceae	<i>Vernonanthura discolor</i> (Spreng.) H. Rob.	VIC40.381	Folha	100	94,75
			Galho	90,95	96,87
Asteraceae	<i>Vernonanthura phosphoric</i> (Vell.) H. Rob.	VIC40.383	Folha	96,62	100
			Galho	100	100
Bignoniaceae	<i>Cybistax antisiphilitica</i> (Mart.) Mart.	VIC40.528	Folha	99,72	100
			Galho	100	-
Celastraceae	<i>Maytenus aquifolia</i> Mart.	VIC40.427	Folha	100	100
			Galho	-	89,47
Euphorbiaceae	<i>Aparisthium cordatum</i> (A. Juss.) Baill.	VIC40.483	Galho	-	100
Euphorbiaceae	<i>Croton celtidifolius</i> Baill.	VIC40.568	Folha	99,95	96,63
			Galho	100	93,30
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum citrifolium</i> A. S.-Hil.	VIC40.612	Folha	100	100
Fabaceae	<i>Inga cylindrica</i> (Vell.) Mart.	VIC40.209	Folha	100	100
			Galho	100	-
Lamiaceae	<i>Aegiphilla integrifolia</i> (Jacq.) Moldenke.	VIC40.539	Folha	93,14	100
			Galho	100	100
Lauraceae	<i>Endlicheria paniculata</i> (Spreng.) J. F. Mac.	VIC40.253	Folha	96,16	91,90
			Galho	100	100
Melastomatacea	<i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin	VIC40.396	Folha	-	100
			Galho	93,96	98,45
Moraceae	<i>Clarisia ilicifolia</i> (Spreng.) L. & Rossberg.	VIC40.265	Folha	98,74	96,63
			Galho	100	100
Myrtaceae	<i>Syzygium jambos</i> (L.) Alston.	VIC40.312	Folha	99,39	-
Salicaceae	<i>Casearia decandra</i> Jacq.	VIC40.392	Folha	100	-
			Galho	100	100
Solanaceae	<i>Acnistus arborescens</i> (L.) Schlttdl.	VIC40.327	Folha	97,33	96,66
			Galho	98,76	100
Solanaceae	<i>Aureliana velutina</i> Sendtn.	VIC40.313	Folha	-	95,08
			Galho	91,84	99,24
Verbenaceae	<i>Aloysia virgata</i> (Ruiz & Pav.) Juss.	VIC40.582	Folha	90,98	97,90
			Galho	99,92	99,62

^a Os valores apresentados mostram a porcentagem de biofilme pré-formado calculado a partir da média das absorvâncias das triplicatas.

^b Extratos das folhas e galhos, orgânico (EO) e aquoso (EA) a 2 mg/mL. Solvente orgânico: Diclorometano/Metanol (1:1). Solvente aquoso: água destilada.

^c Extratos que possuem atividade antibacteriana e por isso não foram testados para biofilme.

Tabela 7: Atividade de extratos vegetais sobre formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* NRS101 ATCC 359883.

Família	Espécie	Voucher	Parte Planta	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NRS101 ATCC359883 ^a	
				EO ^b	EA ^b
Annonaceae	<i>Guatteria australis</i> A. S.-Hil.	VIC40.511	Folha	100	100
			Galho	100	97,75
Asteraceae	<i>Vernonanthura discolor</i> (Spreng.) H. Rob.	VIC40.381	Folha	95,36	98,90
			Galho	99,88	100
Asteraceae	<i>Vernonanthura phosphoric</i> (Vell.) H. Rob.	VIC40.383	Folha	98,97	94,82
			Galho	95,95	100
Bignoniaceae	<i>Cybistax antisiphilitica</i> (Mart.) Mart.	VIC40.528	Folha	93,88	100
			Galho	97,69	100
Celastraceae	<i>Maytenus aquifolia</i> Mart.	VIC40.427	Folha	86,92	100
			Galho	- ^c	97,27
Euphorbiaceae	<i>Aparisthium cordatum</i> (A. Juss.) Baill.	VIC40.483	Galho	-	100
Euphorbiaceae	<i>Croton celtidifolius</i> Baill.	VIC40.568	Folha	88,21	100
			Galho	96,01	100
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum citrifolium</i> A. S.-Hil.	VIC40.612	Folha	100	100
Fabaceae	<i>Inga cylindrica</i> (Vell.) Mart.	VIC40.209	Folha	35,55	100
			Galho	44,38	100
Lamiaceae	<i>Aegiphilla integrifolia</i> (Jacq.) Moldenke.	VIC40.539	Folha	100	100
			Galho	92,27	100
Lauraceae	<i>Endlicheria paniculata</i> (Spreng.) J. F. Mac.	VIC40.253	Folha	100	100
			Galho	95,93	97,34
Melastomatacea	<i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin.	VIC40.396	Folha	-	100
			Galho	100	100
Moraceae	<i>Clarisia ilicifolia</i> (Spreng.) L. & Rossberg.	VIC40.265	Folha	100	100
			Galho	100	100
Myrtaceae	<i>Syzygium jambos</i> (L.) Alston.	VIC40.312	Folha	21,13	-
Salicaceae	<i>Casearia decandra</i> Jacq.	VIC40.392	Folha	98,22	-
			Galho	100	100
Solanaceae	<i>Acnistus arborescens</i> (L.) Schlttdl.	VIC40.327	Folha	100	100
			Galho	100	100
Solanaceae	<i>Aureliana velutina</i> Sendtn.	VIC40.313	Folha	-	99,70
			Galho	100	100
Verbenaceae	<i>Aloysia virgata</i> (Ruiz & Pav.) Juss.	VIC40.582	Folha	93,03	91,43
			Galho	93,20	98,84

^a Os valores apresentados mostram a ação dos extratos sobre biofilme em formação (%) calculado a partir da média das absorbâncias das triplicatas.

^b Extratos das folhas e galhos, orgânico (EO) e aquoso (EA) a 2mg/mL. Solvente orgânico: Diclorometano/Metanol (1:1). Solvente aquoso: água destilada.

^c Extratos que possuem atividade antibacteriana e por isso não foram testados para biofilme.

De acordo com Bazargani e Rohloff (2016), encontrar produtos naturais com atividade sobre o biofilme pré-formado é mais raro que encontrar produtos naturais que impeçam a adesão das células bacterianas. A justificativa para essa dificuldade em transpor a barreira criada pela comunidade bacteriana está na constante evolução e adaptação das bactérias. A exemplo, as bactérias possuem uma alta taxa de mutação, e a proximidade entre as células bacterianas permite transferências de genes de resistência levando à seleção de subpopulações com maior capacidade de aquisição de resistência para os antibióticos. Adicionalmente, as células presentes nas camadas mais profundas do biofilme possuem um metabolismo mais lento, sendo adaptadas a condições limitadas de nutrientes e oxigênio, levando a uma diferenciação celular mais resistente a antibióticos. Associados a esses mecanismos de resistência estão os mecanismos de resistência das células individuais, que aumentam a resistência do biofilme a moléculas antibacterianas. Para produtos naturais, acreditasse que a diversidade de estruturas químicas das moléculas encontradas nos extratos vegetais podem interferir na difusão pela estrutura do biofilme (PENESYAN et al.,2015).

No entanto, estudos com produtos naturais que impedem a formação de biofilme têm obtido resultados promissores. Silva e colaboradores (2015) avaliaram 33 extratos de 14 espécies vegetais diferentes a uma concentração de 4 mg/mL, sendo que 10 extratos apresentaram potencial antibiofilme, por diminuírem em 50% a formação do biofilme. Tendo em vista que a concentração utilizada neste trabalho (2 mg/mL) é equivalente a metade usada por Silva e colaboradores (2015), pode-se observar que os extratos orgânicos de folhas de *Syzygium jambos* e de folhas e galhos de *Inga cylindrica* apresentaram forte potencial antibiofilme.

Nenhum estudo, até o presente momento, relatou a atividade antibiofilme de extratos de *Inga cylindrica* e *Syzygium jambos*. Porém, a atividade antibacteriana da espécie *S. jambos* e do gênero *Inga* já foi confirmada por diversos estudos (MACEDO et al., 2016; MONTALVO et al., 2013; HAQUE et al., 2015; DJIPA et al., 2000; MURUGAN et al., 2011). *S. jambos* possui produtos naturais isolados, e sua atividade antibacteriana foi atribuída a taninos (DJIPA et al., 2000; MURUGAN et al., 2011; HAQUE et al., 2015).

Tendo em vista a pouca informação sobre a atividade antibacteriana e a ausência de estudos sobre o potencial antibiofilme das espécies *S. jambos* e *I. cylindrica*, ressalta-se a importância e contribuição que estas podem oferecer no combate a patógenos bacterianos clinicamente importantes. Sendo assim, faz-se necessária a continuidade dos estudos, investigando o mecanismo de ação e o perfil fitoquímico dessas espécies.

Os estudos fitoquímicos da espécie vegetal *Inga cylindrica* que apresentou atividade antibiofilme serão realizados futuramente devido à falta de extrato para dar prosseguimento ao fracionamento biomonitorado. Não se justifica prosseguir com estudos fitoquímicos para a espécie *Syzygium jambos*, uma vez que seu potencial antibiótico já é bem documentado até mesmo com produtos naturais isolados. Porém estudos futuros para a determinação do mecanismo de ação desses produtos naturais contra o biofilme em formação são necessários.

Como mostrado anteriormente, o extrato orgânico de folhas de *Miconia latecrenata* (EOFML) apresentou forte potencial antibiótico de amplo espectro, uma vez que foi ativo frente às duas estirpes bacterianas testadas (Tabela 5). Em levantamento realizado na literatura científica, pode-se verificar uma carência de estudos químicos e farmacológicos dessa espécie arbórea nativa do bioma Mata Atlântica. Diante deste cenário, foi realizada a pesquisa fitoquímica de *M. latecrenata*, a fim de obter maior conhecimento sobre a identidade química da(s) possível (is) molécula (as) responsável (is) pela sua ação antibiótica.

5.4. FRACIONAMENTO BIOMONITORADO DE *Miconia latecrenata* (DC.) Naudin.

Apartir do extrato previamente selecionado realizou-se o fracionamento biomonitorado por partição líquido-líquido, utilizando 1g de extrato orgânico de folhas de *Miconia latecrenata* (EOFML) tratado com solventes de diferentes polaridades (Tabela 8). Sendo uma técnica considerada rápida, de fácil execução e economicamente viável, a PLL obteve um rendimento de 83,48% do total de extrato inicialmente utilizado (1 g), tendo apenas 16,52% de perda, que pode ser justificada durante o manuseio da técnica. A fração mais

enriquecida foi a aquosa com 44,2% de rendimento, mostrando que o EOFML possui quantidades significativas de moléculas polares.

Tabela 8: Rendimento (%) das respectivas frações do EOFML por PLL.

Solvente	Sigla	Recuperado (mg)	Rendimento (%)
Hexano	EOFML-H	236	23,6
Diclorometano	EOFML-D	32	3,2
Acetato de etila	EOFML-AE	41	4,1
Butanol	EOFML-B	83,8	8,38
Água	EOFML-A	442	44,2
Total		834,8	83,48
Perda		165,2	16,52

5.5. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DOS COMPOSTOS PRESENTES NO EXTRATO E NAS FRAÇÕES DE *Miconia latecrenata*.

Realizou-se uma análise qualitativa por CCD a fim de identificar as classes fitoquímicas presentes no EOFML e nas cinco diferentes frações obtidas após fracionamento por PLL. As classes de metabólitos secundários encontradas no extrato e nas frações de *Miconia latecrenata* podem ser verificadas na Tabela 9.

Tabela 9: Resultado da prospecção fitoquímica realizada com o EOFML e suas respectivas frações.

Classes	EOFML	EOFML-H	EOFML-D	EOFML-AE	EOFML-B	EOFML-A
Polifenol	+	+	+	+	+	+
Óleo essencial	+	+	+	-	-	-
Triterpeno e Esteróide	+	+	+	-	-	-
Flavonoide	+	-	-	+	+	+
Cumarina	-	-	-	-	-	-
Antraquinona	-	-	-	-	-	-
Alcaloide	-	-	-	-	-	-
Saponina	+	+	+	+	+	-

***Legenda:** (+) presença, (-) ausência.

A triagem fitoquímica do EOFML para as classes testadas apenas não apresentou antraquinona, alcaloide e cumarina. Quanto às frações, se observa um perfil fitoquímico diferente, no qual a presença de óleo essencial se deu apenas nas frações de diclorometano e hexano, os triterpenos e esteróides

estão presentes apenas nas frações de hexano e diclorometano, as saponinas ficaram concentradas na fração de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, e os flavonoides apenas na fração de acetato de etila, butanol e água, indicando que a PLL foi eficiente na separação das classes.

Há uma carência de estudos do perfil fitoquímico de *Miconia latecrenata*. Gotinjo (2012) identificou a presença de taninos e saponinas no extrato aquoso de folhas de *Miconia latecrenata*, único estudo encontrado que relata o perfil fitoquímico da espécie. A ausência de saponinas na fração aquosa do EOFML pode ser justificada pelo solvente extrator utilizado, diclorometano/metanol (1:1), para produção do extrato orgânico.

No entanto para o gênero *Miconia* foi relatada abundante presença de triterpenos, polifenóis e flavonóides (CUNHA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2008).

5.6. MONITORAMENTO POR HPLC-DAD DO FRACIONAMENTO BIOMONITORADO

A identidade de espécies vegetais é considerada uma ferramenta importante e confiável para a identificação de extratos vegetais, bem como para monitorar quimicamente o fracionamento. Além disso, os perfis cromatográficos podem ser utilizados para identificar ou avaliar a qualidade de amostras referentes a uma determinada espécie, contribuindo de forma indireta, para a garantia da eficácia e segurança de fitoterápicos que contemplem o extrato investigado (GOODARZI et al., 2013; SKIRY CZ et al., 2016).

O perfil fitoquímico ou impressão digital do EOFML assim como das frações resultantes do fracionamento pela técnica PLL foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Performance. Nos cromatogramas obtidos usando o detector DAD em comprimento de onda de 254 nm (Figura 8), pode-se observar a presença majoritária de compostos polares no EOFML, de acordo com a concentração de picos com tempo de retenção abaixo de 10 min. Observa-se que, para as frações de hexano e diclorometano houve uma concentração de compostos mais lipofílicos, provavelmente provenientes de pigmentos de clorofila e triterpenos. Conseqüentemente, ocorreu um

enriquecimento dos compostos polares nas frações de acetato de etila, butanol e água, apresentando similaridades nos seus perfis, principalmente entre acetato de etila e butanol. De acordo com os resultados de prospecção fitoquímica, essas três frações apresentam, dentre as classes polares de metabólitos secundários detectadas, polifenóis, flavonoides e saponinas, sendo esta última, ausente para fração aquosa.

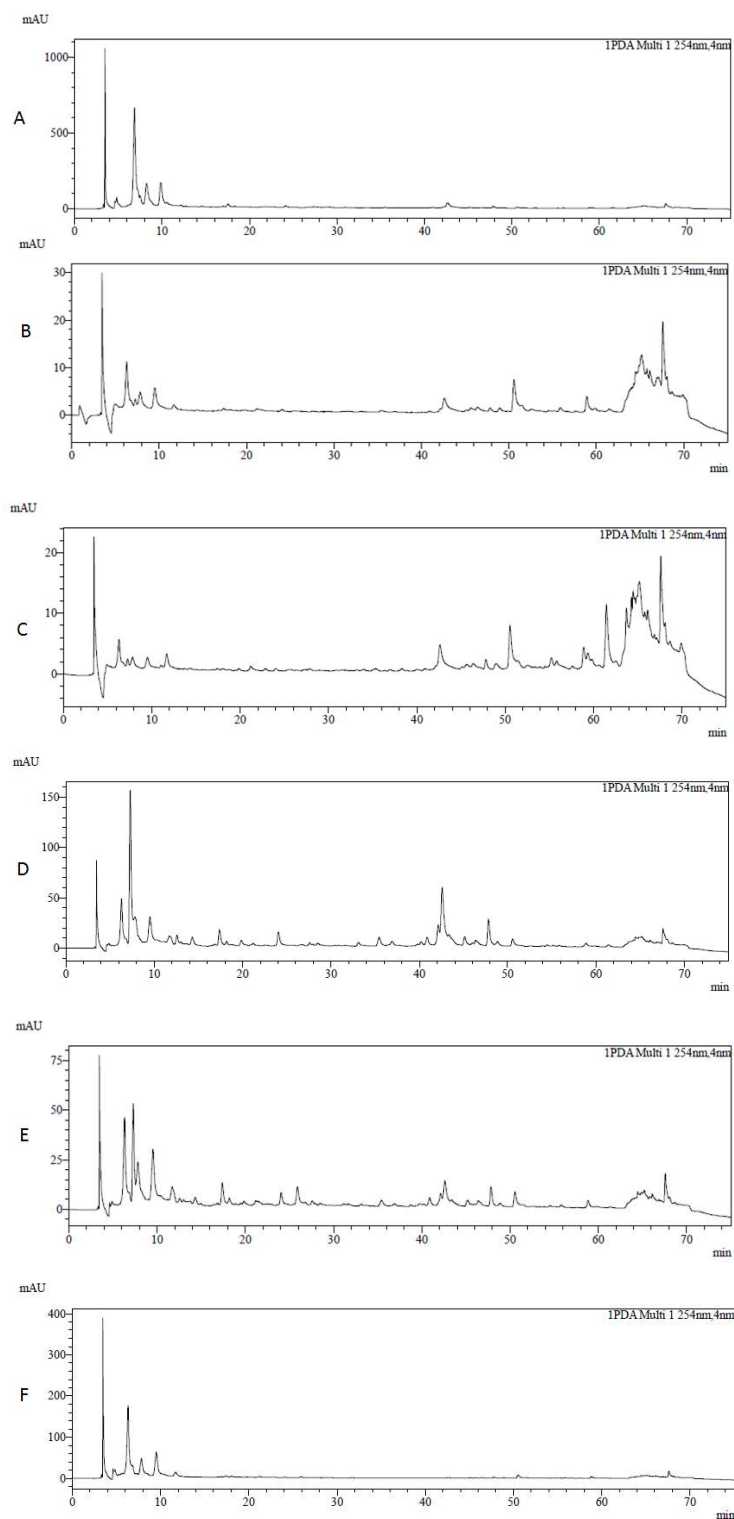


Figura 8: Impressão digital do extrato e das frações de *Miconia latecrenata*.

*Legenda: **A:** EOFML; **B:** EOFML-H; **C:** EOFML-D; **D:** EOFML-AE; **E:** EOFML-B; **F:** EOFML-A. Condições de análise vide item 4.4.3, pág. 22.

5.7. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS FRAÇÕES de *Miconia latecrenata* (DC.) Naudin.

Foi avaliada a atividade antibacteriana das frações obtidas do EOFML frente *S. aureus* e *P. aeruginosa* na concentração de 50 mg/mL. Para isso, seguiu-se o mesmo protocolo descrito anteriormente para o teste de difusão em ágar. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 10.

Tabela 10: Halos de inibição (mm) do EOFML e das frações obtidas por PLL pelo teste de difusão em ágar.

Amostras	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
EOFML	13,8	10,6
EOFML-H	0	0
EOFML-D	0	0
EOFML-AE	8,3	14,6
EOFML-B	9,3	12,3
EOFML-A	11,6	12,6

De acordo com os resultados, observa-se que os halos de inibição das frações para *S. aureus* foram menores que aquele obtido para o EOFML, o que evidencia uma distribuição dos compostos bioativos presentes no EOFML entre as frações de acetato de etila, butanol e água. Como as frações hexânica e diclorometânica não apresentaram atividade antimicrobiana, pode-se afirmar que o potencial antibiótico do EOFML é atribuído a compostos de maior polaridade. Neste caso, as classes relacionadas a esta atividade, de acordo com a prospecção fitoquímica, podem ser atribuídas aos polifenóis, flavonoides e saponinas.

Também foi possível observar que, frente à bactéria *P. aeruginosa*, as frações em acetato de etila, butanol e aquosa apresentaram halos de inibição maiores que o EOFML, indicando aumento da atividade antibacteriana provavelmente devido a remoção de substâncias interferentes ou concentração de moléculas ativas nessas frações. A fração em acetato de etila, com o maior halo entre as frações ativas, apresentou um halo de inibição para *P. aeruginosa*

de 14,6 mm, enquanto que o EOFML forneceu um diâmetro menor (10,6 mm) (Tabela 10, Figura 9).

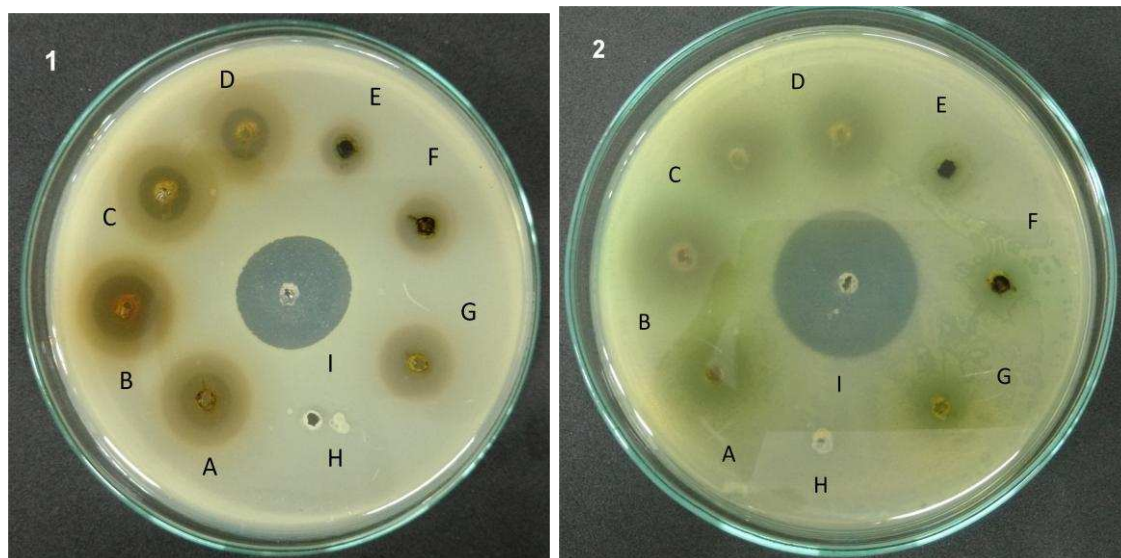


Figura 9: Halos de inibição do EOFML e de suas respectivas frações (50 mg/mL) pelo teste de difusão em ágar contra *Staphylococcus aureus* (1) e *Pseudomonas aeruginosa* (2).

***Legenda:** A: EOFML; B: EOFML-A, C: EOFML-B; D: EOFML-AE; E: EOFML-D; F: EOFML-H; G: EOFML; H: controle negativo, DMSO; I: controle positivo, para *S. aureus*, ampicilina 10 mg/mL e para *P. aeruginosa*, gentamicina a 10 mg/mL.

A CIM das frações ativas (EOFML-AE, EOFML-B e EOFML-A) também foi determinada segundo protocolo descrito anteriormente, porém foi testada contra mais duas estirpes bacterianas, a Gram-positiva *Bacillus subtilis* ATCC 23857 e a Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 25922 (Tabela11).

Tabela 11: Concentração inibitória mínima, em mg/mL, do EOFML e das suas respectivas frações.

Amostras	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 23857	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
EOFML	0,31	2,5	0,62	>10
EOFML-AE	0,62	1,25	0,62	>10
EOFML-B	0,62	2,5	0,62	>10
EOFML-A	0,31	2,5	0,62	>10

Os valores da CIM da maior parte das frações frente às bactérias Gram-positivas foram maiores ou iguais a CIM do EOFML. Esta observação sugere um sinergismo entre as classes de produtos naturais presentes no extrato, que são responsáveis pela atividade antibacteriana, sendo assim, o uso do EOFML como um possível produto com ação antibiótica, para Gram-positivas, seria mais viável e economicamente mais vantajoso, pois os processos de fracionamento em grande escala são bastante caros.

A CIM da fração em acetato de etila foi menor (1,25 mg/mL) que a do EOFML (2,5 mg/mL) para a *P.aeruginosa*, sugerindo que o(s) composto(s) responsável(is) pela atividade antibacteriana foi concentrado nessa fração. Porém para *Echerichia coli* a CIM tanto do extrato bruto quanto das frações foi maior que 10 mg/mL, tendo uma atividade antibacteriana muito fraca.

De acordo com a classificação de Aligianis e colaboradores (2001) relatada anteriormente, a CIM do EOFML para bactérias Gram-negativas é considerada de forte inibição, e para a Gram-positiva, após o fracionamento, obteve-se uma melhoria de fraca, encontrada no EOFML, para moderada inibição bacteriana para EOFML-AE.

A espécie *Miconia latecrenata* (DC.) Naudin (Figura 10) pertencente a família Melastomataceae, popularmente conhecida como “pixeicuçu”, “jacatirão” ou “pixiricão”, é endêmica da Mata Atlântica. São poucos os estudos que investigam o potencial farmacológico da espécie, já tendo sido relatado o efeito citostático em células tumorais e um estudo que investiga a atividade antibacteriana, porém, este estudo foi realizado com técnicas de extração e com metodologia para avaliação da atividade antimicrobiana diferente da testada neste trabalho, sendo a atividade antimicrobiana comprovada apenas no extrato aquoso bruto pelo teste do halo e por CIM em uma única estirpe bacteriana de *S.aureus* (GOLDENBERG, 2010; PAIS, 2011; GONTIJO, 2012). Outros estudos referentes ao sistema reprodutivo, levantamento morfológico e fitossociológico são encontrados (VILELA et al.,1999; GOLDENBERG e VARRASIN, 2001; CRUZ-BARROS et al., 2007 *apud* GONTIJO, 2012).

A família Melastomataceae possui cerca de 4500 espécies em 166 gêneros, sendo o gênero *Miconia* o maior gênero com 1000 espécies que estão distribuídas em áreas tropicais das Américas (RENNER, 1993). Estudos com *Miconia* spp. relatam o potencial antitumoral, analgésico, antimicrobiano,

antioxidante, tripanossomicida e atividade antimalária (HASRAT et al.,1997; CELOTTO et al.,2003; SPESSOTO et al.,2003; CUNHA et al.,2008; RODRIGUES et al.,2008; SERPELONI et al.,2008; PIERONI et al., 2001; SERPELONI ET AL.,2011 *apud* GONTIJO,2012). Recentemente também foi relatada a ação inibidora de enzimas α -amilase e α -glucosidase de extratos provenientes de *Miconia*, sugerindo seu emprego como adjuvante no tratamento do diabetes *mellitus* (ORTÍZ-MARTINEZ et al.,2016).



Figura 10: *Miconia latecrenata* (DC.) Naudin (Melastomataceae)

Outro estudo que investiga o potencial antimicrobiano de diversos extratos orgânicos de folhas de espécies do gênero *Miconia* a 30 mg/mL, a saber *M. cabucu*, *M. rubiginosa* e *M. stenostachya*, frente a diferentes estirpes bacterianas mostrou halos de inibição entre 9 a 18 mm (RODRIGUES et al.,2008). Os extratos metanólico para *Miconia stenostachya* e *Miconia rubiginosa* e o extrato em clorofórmio para *Miconia cabucu* apresentaram atividade, porém demonstraram altos valores de CIM, entre 1,5 a 10 mg/mL (RODRIGUES et al.,2008). Comparações dentro do presente trabalho mostram que *Miconia latecrenata* apresentou melhores resultados que outras espécies do mesmo gênero em relação ao potencial antibacteriano.

Rodrigues e colaboradores (2008) também identificaram e isolaram diversos compostos químicos presentes nas espécies de *Miconia* atribuindo a atividade antimicrobiana aos triterpenos e flavonoides encontrados.

5.8. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS PRESENTES NA FRAÇÃO ATIVA DE *Miconia latecrenata*.

Técnicas hífenadas como UPLC acoplado a espectrometria de massas são amplamente utilizadas em diversos estudos para identificação de produtos naturais em extratos vegetais, uma vez que a junção dessas duas técnicas permite a separação com seletividade e sensibilidade adequadas para obter a caracterização estrutural dos compostos químicos presentes em matrizes complexas como extratos vegetais (SKIRYCZ et al., 2016).

A identificação dos compostos químicos presentes na fração de acetato de etila do EOFML foi realizada utilizando a técnica hífenada UPLC-UV-MS. Para detecção pelo espectrômetro de massas foi empregado a fonte de ionização por *eletron spray* nos modos positivo e negativo. A Figura 11 mostra o perfil cromatográfico obtido para EOFML-AE pelo detector UV em comprimento de onda de 254 nm, mostrando o predomínio de compostos de alta polaridade, com tempo de retenção inferior a 4 min.

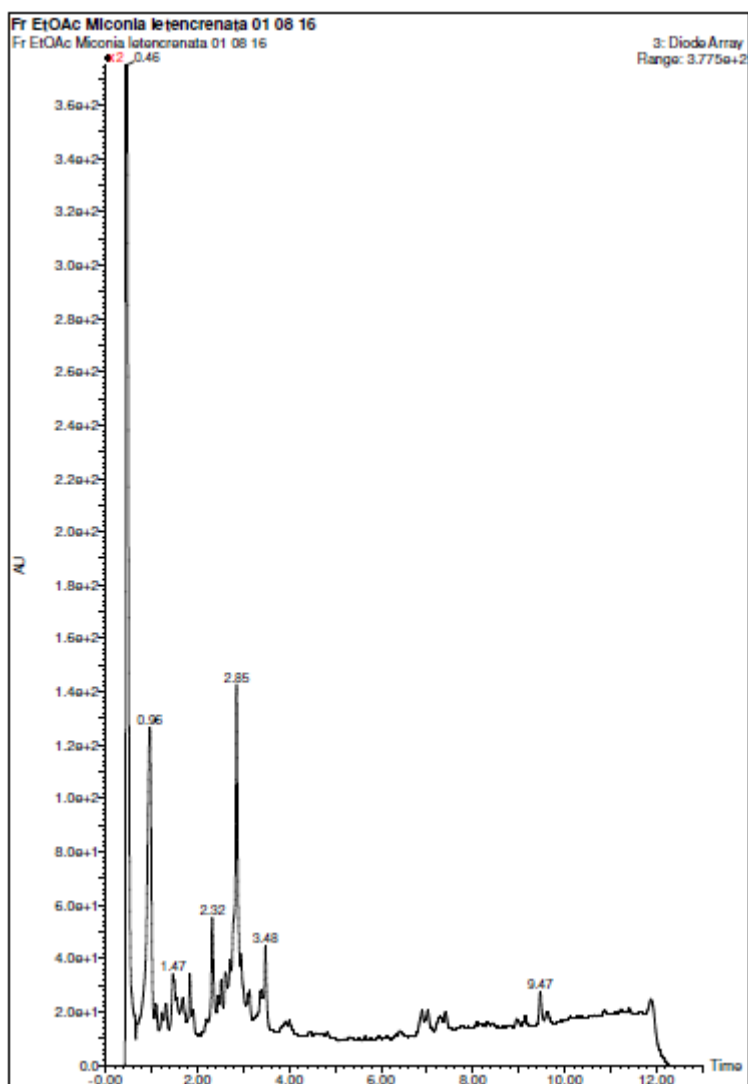


Figura 11: Perfil cromatográfico por UPLC-UV em 254 nm da fração de acetato de etila do EOFML.

*Legenda: Condições de análise vide item 4.4.4, pág. 23.

A composição fitoquímica da fração bioativa analisada por UPLC-UV-MS levou à identificação de alguns dos compostos majoritários, sendo todos derivados de flavonoides. O grande número de picos registrados no cromatograma indicou que a fração ainda se manteve como uma mistura complexa, não sendo possível a identificação dos compostos minoritários. No entanto, o principal foco do trabalho foi verificar os compostos majoritários da espécie que poderiam estar relacionados com a atividade antibacteriana, visando assim, uma futura aplicação industrial da planta no campo farmacêutico. Neste caso, os flavonoides seriam importantes marcadores ativos para fitoterápicos produzidos a partir dessa espécie vegetal.

Para identificação de flavonoides, o UV é muito empregado, pois os mesmos possuem bandas de absorção características, uma com máximo de absorção em 240-285 nm referente ao anel A e outro com máximo de absorção em 300-550 nm referente ao anel B. A posição e intensidade dessas bandas fornecem informações sobre a natureza do composto e o seu padrão de substituição (ÁSSIMOS, 2014).

Dos picos identificados como sendo referentes a flavonoides pelo perfil espectral no UV, obtiveram-se seus dados espectrais por ESI-MS das suas respectivas fragmentações por espectrometria de massas, sendo os íons resultantes comparados com dados da literatura. A Figura 12 mostra o *fingerprint* de EOFML-AE por ESI-MS, obtidos nos modos negativo (ESI⁻) e positivo (ESI⁺). Por se tratar de compostos flavonoídicos, com a presença de grupos fenólicos com caráter ácido, os *fingerprints* obtidos por ESI-MS em modo negativo foram mais eficientes para a ionização dos compostos presentes nesta fração. Dessa forma, para o presente trabalho, as análises em modo negativo serão apresentadas e usadas na discussão.

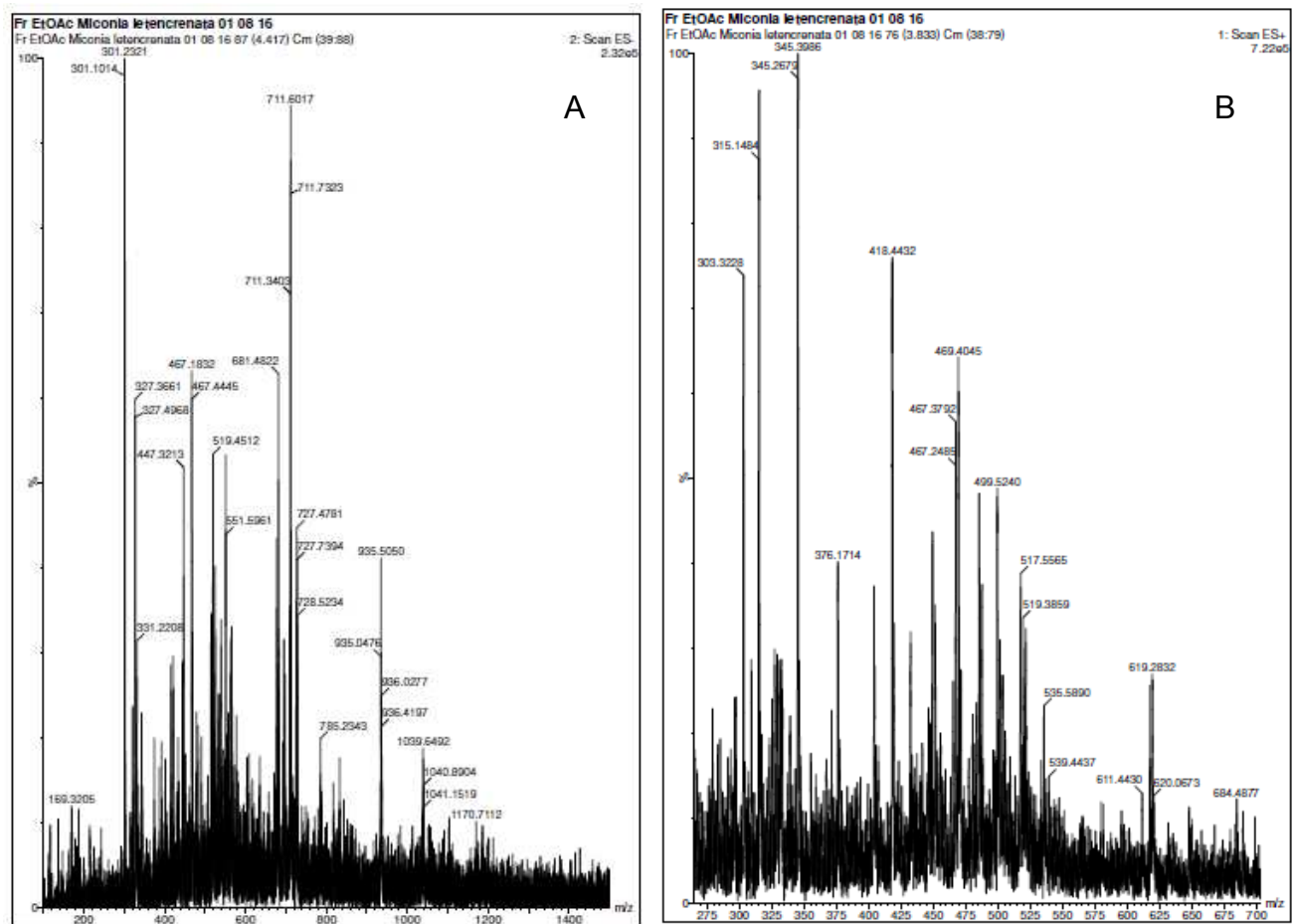


Figura 12: *Fingerprint* por ESI-MS da fração em acetato de etila de *Miconia latecrenata*: (A) modo negativo ESI⁻ e (B) modo positivo ESI⁺.

Assim, foram identificados pela primeira vez na espécie *Miconia latecrenata* compostos flavonoídicos derivados da quercetina (Figura 13, Tabela 12). Os espectros referentes a esses flavonoides encontram-se nas Figuras 14, 15, 16 e 17.

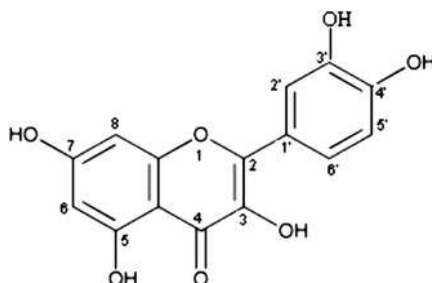


Figura 13: Estrutura química da quercetina identificado no EOFML-AE.

Tabela 12: Dados encontrados na análise por UPLC-UV-MS para EOFML-AE.

SUBSTÂNCIA	tR ^a (min)	UV(nm)	[M+H] ⁺ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS MS
Quercetina	2,85	253; 361	303	301	301; 283; 257; 229; 173; 145;117
Metoxiquercetina	3,48	220; 366	-	315	315, 300; 215; 199; 151;135
Derivado pentosídico de metoxiquercetina	3,13	217; 253; 353	449	447	446; 315; 300; 271, 243, 161; 151
Quercetina-3-O-ramnosídeo	3,11	217; 253; 360	449	447	447; 301; 271; 151

^a tR: tempo de retenção

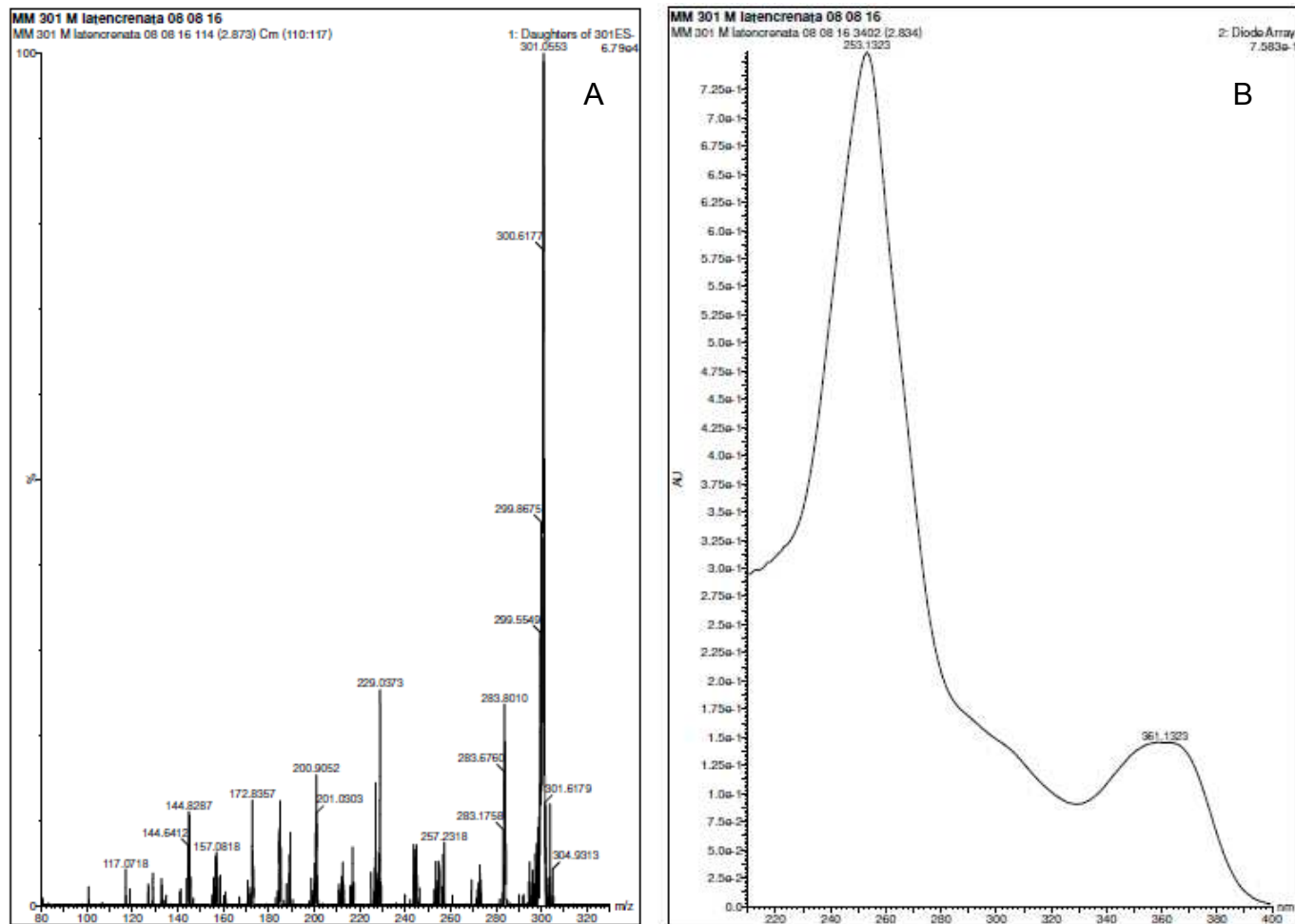


Figura 14: Espectros de massas ESI⁻ (A) e no UV (B) referente ao flavonoide quercetina (301m/z, T_R 2,85 min) identificado na fração de acetato de etila de *Miconia latecrenata*.

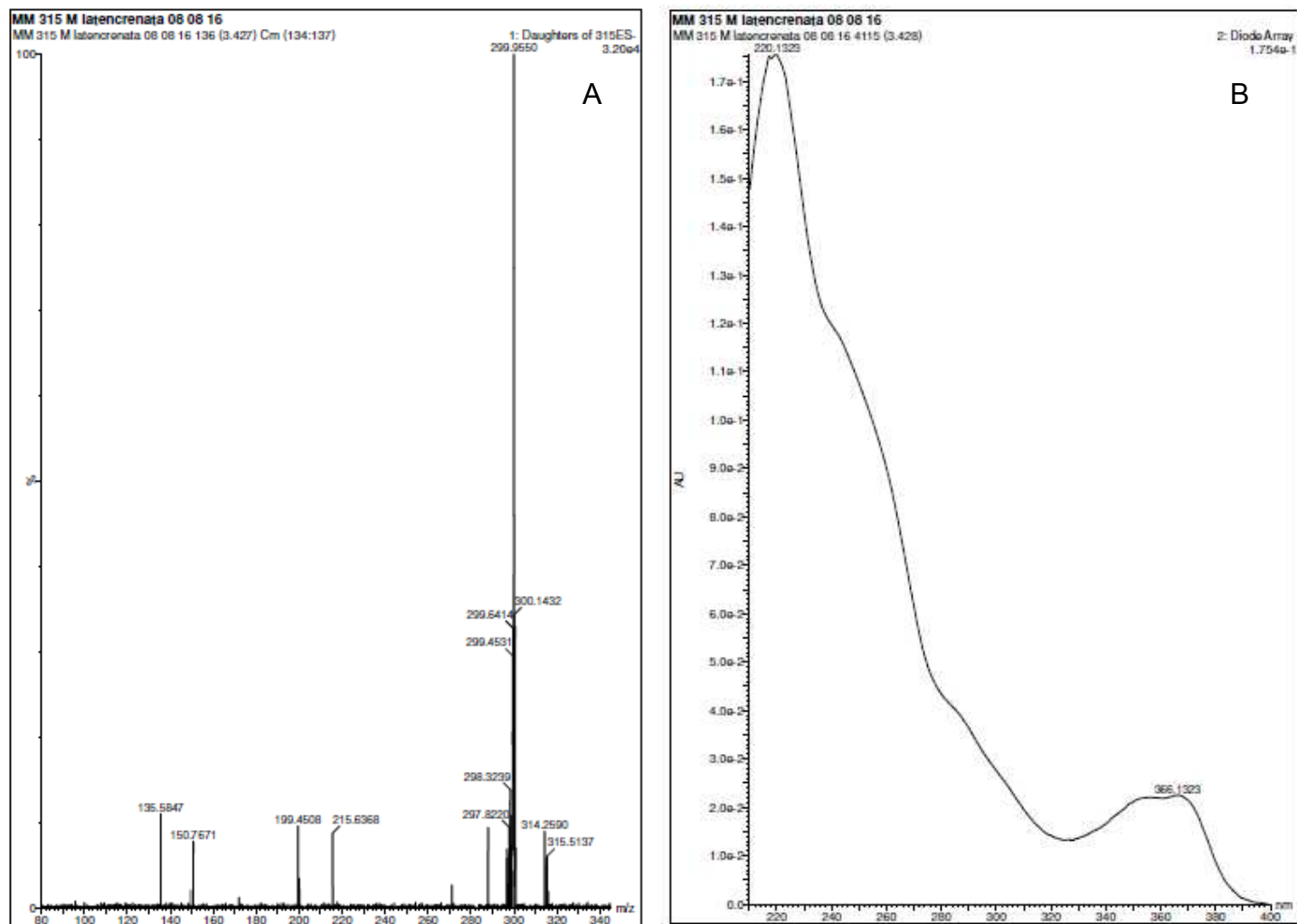


Figura 15: Espectros de massas ESI⁻ (A) e no UV (B) referente ao flavonoide metoxyquercetina (315m/z, T_R 3,48 min) identificado na fração de acetato de etila de *Miconia latecrenata*.

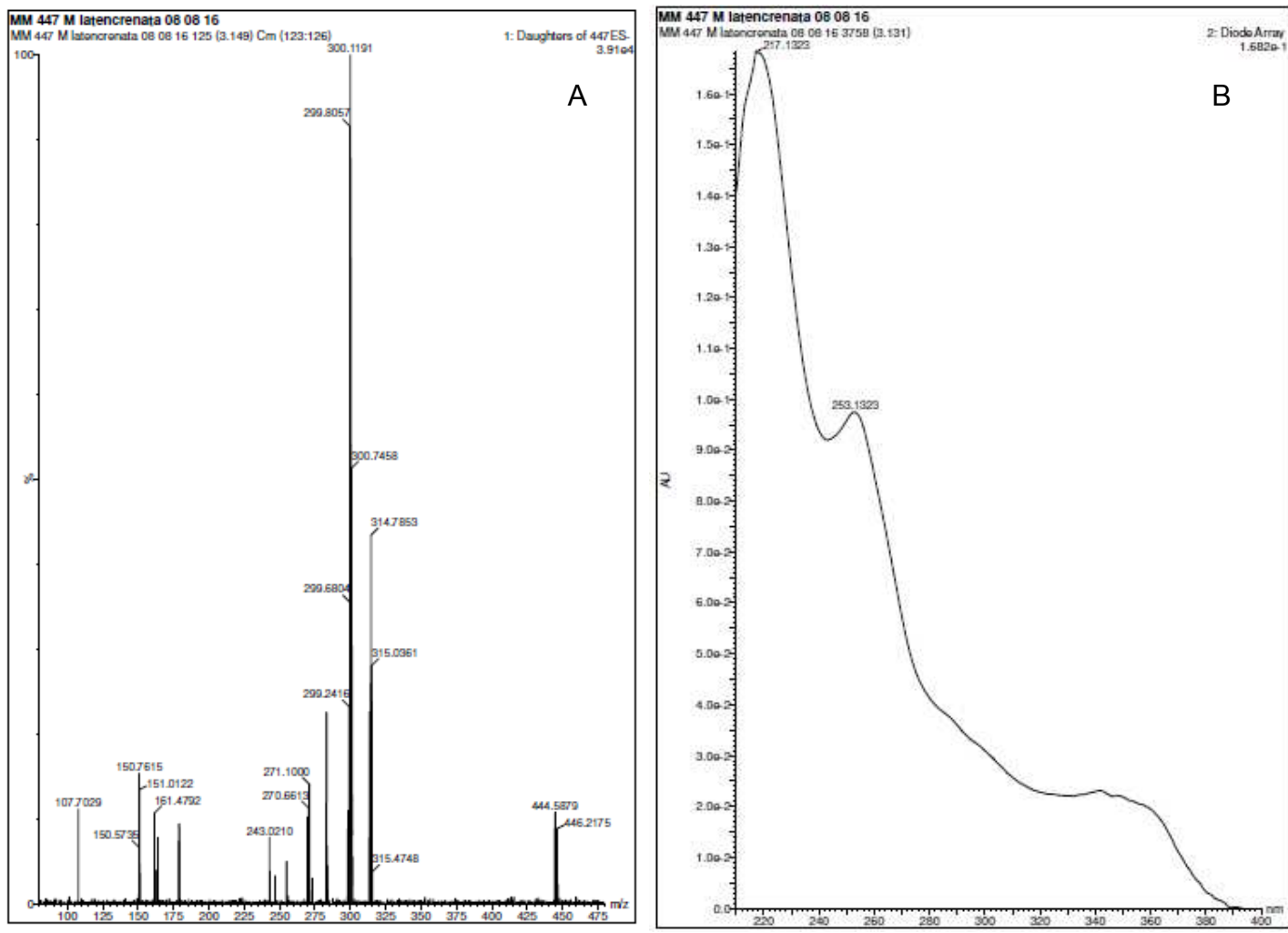


Figura 16: Espectros de massas ESI⁻ (A) e no UV (B) referente ao derivado pentosídico de metoxiquercetina (447m/z, T_R 3,13 min) identificado na fração de acetato de etila de *Miconia latecrenata*.

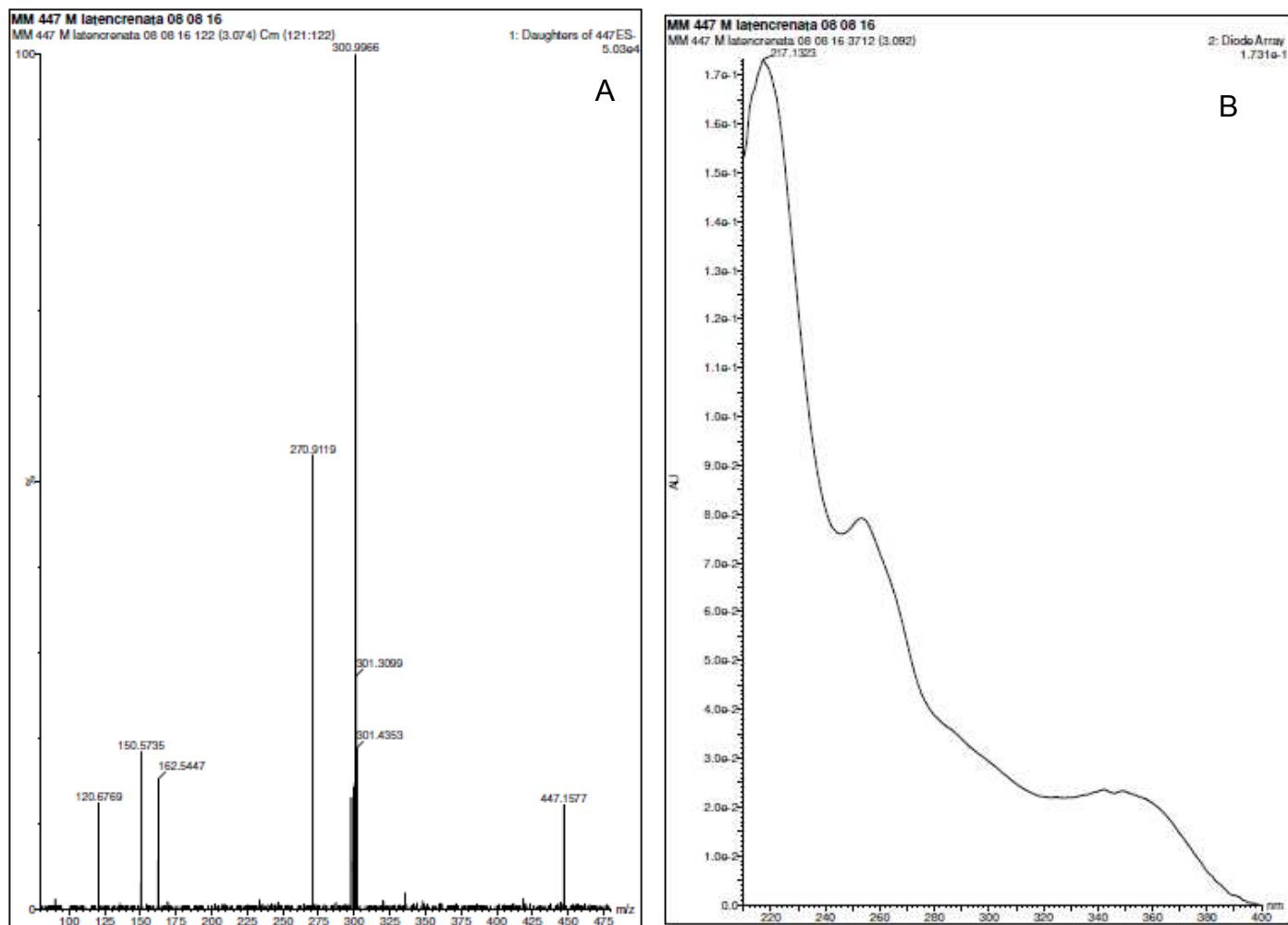


Figura 17: Espectros de massas ESI⁻ (A) e no UV (B) referente ao flavonoide quercetina-3-O-ramnosideo (447m/z, T_R 3,11 min) identificado na fração de acetato de etila de *Miconia latecrenata*.

Algumas das fragmentações observadas nos espectros dos flavonoides foram identificadas, para **quercetina**: 283 – H₂O (16 u.), 257 – CO₂ (44 u.) e 229 – C₃H₄O₂ (72 u.); **metoxiquercetina**: 151 (vem da fragmentação retro Diels-Alder); **derivado pentosídico de metoxiquercetina**: 315 – pentose (132 u.), 300 – CH₃ (15 u.) perdida após perda da pentose, 271 - CO₂ (44 u.) perdida após perda da pentose e 151 (vem da fragmentação retro Diels-Alder); **quercetina-3-O-ramnosídeo**: 301 – ramnose (146 u.) e 271 – CH₂O (30 u.)

Os flavonoides possuem fragmentações da reação retro Diels-Alder, onde ocorre uma clivagem no anel C, no qual os valores m/z dependem dos substituintes de cada um dos anéis A e B (SILVIA et al., 2009). Uma proposta geral de fragmentação para flavonol pode ser visualizada na Figura 18.

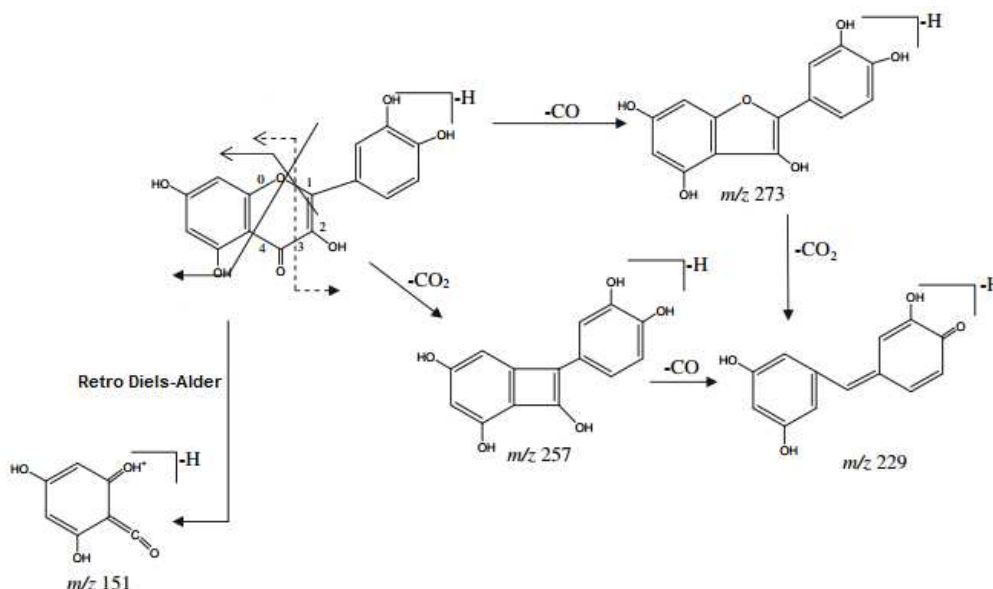


Figura 18: Proposta geral de fragmentação para flavonol (DUEÑAS et al., 2008).

A quercetina e seus derivados identificados em EOFML-AE também foram encontrados em outras espécies de *Miconia* (RODRIGUES et al., 2008). A atividade antibacteriana da quercetina, bem como de seus derivados, vem sendo bastante documentada em diversos estudos (MEGDICHE-KSOURI et al., 2015; DAGLIA, 2012; BASTOS et al., 2016; SAMEEH et al., 2016).

A atividade antibacteriana dos flavonoides já é bastante conhecida, podendo ocorrer de três formas: morte direta ou por sinergia das bactérias ou atenuação da patogenicidade bacteriana. No entanto, estudos relatam que os flavonoides antibacterianos podem ter múltiplos alvos celulares, ao invés de um local de ação específico (CUSHNIE e LAMB, 2011).

Outros mecanismos, já foram documentados, como a atividade inibitória contra a bomba de efluxo de *S. aureus* resistente à ampicilina, restrição da síntese de peptidoglicano e ribossomos em *Escherichia coli* resistente à amoxicilina e inibição de diferentes tipos de lactamases, sendo as principais enzimas que inativa os antibióticos via hidrólise (ROCCARO et al, 2004; EUMKEB et al., 2012; TENOVER, 2006; FAST e SUTTON , 2013 *apud* XIE et al., 2015).

A atividade antibacteriana dos flavonoides depende da sua estrutura, especialmente das substituições dos anéis aromáticos. Vários extratos vegetais com atividades antibacterianas têm tido sua atividade relacionada a flavonoides, principalmente os que possuem propriedades hidrofóbicas, tais como grupos prenil (XIE et al., 2015; CUSHNIE e LAMB, 2005).

Em monócitos infectados por *Salmonella typhimurium*, flavonoides como resveratrol e a quercetina reduziram a produção de óxido nítrico, diminuindo a citotoxicidade gerada pela sua reação com anions superóxidos formando peroxinitrito, que é altamente reativo. Também inibiram a viabilidade celular dos patógenos bem como a proliferação dos mesmos e, conseqüentemente, diminuiu a morte celular das células hospedeiras e os efeitos tóxicos da infecção bacteriana (PAOLILLO et al., 2011).

Flavonois, como a quercetina e seus derivados, devido aos grupos hidroxila, parecem melhorar a atividade antibacteriana, indicando que os flavonois podem ser melhores agentes antibacterianos que outros flavonoides, pois os grupos fenólicos hidroxilados podem apresentar afinidade com as proteínas e, dessa forma, atuarem como inibidores de enzimas bacterianas, assim como interferem nas suas vias de síntese, atrapalhando o desenvolvimento do microrganismo (XIE et al., 2015; CUSHNIE e LAMB, 2005).

5.9. DETERMINAÇÃO DO EFEITO BACTERICIDA E/OU BACTERIOSTÁTICO DE *Miconia latecrenata*.

A determinação do efeito bactericida e/ou bacteriostático do EOFML foi realizado com a bactéria *S. aureus* pela facilidade na contagem das colônias isoladas, uma vez que o método empregado foi o de microgota em meio de cultura ágar.

Segundo Mitchell e colaboradores (2012), um composto é considerado bacteriostático quando há uma redução do inóculo original em até $<3 \log_{10}$ UFC/mL e bactericida quando a menor concentração do extrato que reduziu o inóculo original em $>3 \log_{10}$ UFC/mL. Pode-se observar que não houve redução de \log UFC/mL na CIM até aproximadamente 24 h, comprovando o efeito bacteriostático (Figura 19).

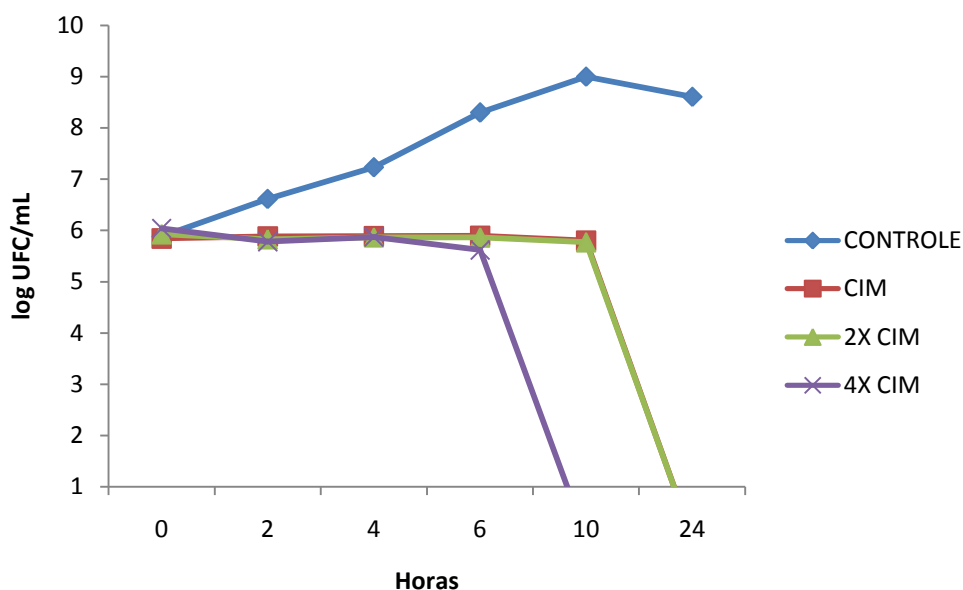


Figura 19: Determinação do efeito bacteriostático do EOFML sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

A definição bacteriostática e bactericida está bem determinada *in vitro*, porém para um agente antibacteriano, esta definição aplica-se apenas ao organismo particular contra o qual foi testado sob as condições de teste utilizadas. Na clínica, os efeitos bactericidas e bacteriostáticos de diversos antibacterianos não são absolutos. Nem sempre um antibiótico bactericida *in*

vitro, terá eficácia clínica uma vez que fatores como o mecanismo de defesa do hospedeiro, o local da infecção e a farmacocinética e farmacodinâmica do agente antibacteriano podem interferir na resposta terapêutica (PANKEY e SABATH, 2004).

A maioria dos autores concorda que a possível superioridade da atividade bactericida sobre antibacterianos bacteriostáticos é de pouca relevância clínica no tratamento da grande maioria das infecções bacterianas Gram-positivas. *In vitro*, o efeito bacteriostático e/ou bactericida pode fornecer informações sobre potenciais agentes antibacterianos, mas este é apenas um dos muitos fatores necessários para garantir a eficiência terapêutica (PANKEY e SABATH, 2004).

A exemplo, a atividade bacteriostática de clindamicina é eficaz na inibição da produção de toxinas de *S. aureus* em culturas de fase de crescimento e estacionárias, sendo o antibiótico de escolha para o tratamento da síndrome do choque tóxico estafilocócico e estreptocócico (RUSSELL e PACHOREK, 2000).

5.10. ANÁLISE DA INTERAÇÃO EXTRATO/ANTIBIÓTICO

A interação do EOFML com os antibióticos ampicilina, gentamicina e tetraciclina foi testada neste trabalho. O efeito da interação de EOFML foi testado apenas sobre *S. aureus* e *B. subtilis* uma vez que as frações não mostraram CIM inferiores ao extrato bruto. No entanto, para *P. aeruginosa* a fração de acetato de etila mostrou menor CIM em relação ao EOFML, sendo então escolhida para a realização do teste. Devido à CIM elevada tanto do extrato quanto das frações, não se avaliou o efeito sobre *E. coli*.

O método *checkerboard* foi utilizado para determinação das interações entre os antibióticos e o EOFML e a fração em acetato de etila. As concentrações de extratos e antibióticos foram variadas e combinadas de 2X CIM até 1/8X CIM. Para avaliação do crescimento bacteriano, mais uma vez, foi utilizada a incubação com o INT. Com base nas menores concentrações combinadas em que houve inibição do crescimento bacteriano foi calculado o índice de concentrações fracionárias inibitórias (FIC), e determinado o tipo de interação (Tabela 13).

As interações são interpretadas com base no Σ FIC. Quando este valor é $\leq 0,5$, considera-se a interação como sinérgica; para $0,5 < \Sigma$ FIC ≤ 1 a interação é aditiva; para $1 < \Sigma$ FIC ≤ 4 a interação indiferente; e valores maiores que 4 são de antagonismo (PALANIAPPAN e HOLEY, 2010).

Tabela 13: Avaliação do tipo de interação de *Miconia latecrenata* com os antibióticos para diferentes bactérias.

Estirpes	Avaliação da interação	Antibióticos		
		Ampicilina	Gentamicina	Tetraciclina
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	FIC antibiótico	1/8XCIM	1/8XCIM	1/8XCIM
	FIC EOFML	1/4XCIM	1XCIM	1/2XCIM
	Σ FIC	0,45	1,125	0,60
	Interação	Sinérgica	Indiferente	Aditiva
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	FIC antibiótico	1/8XCIM	1XCIM	1/8XCIM
	FIC EOFMI-AE	1/2XCIM	1/8XCIM	1/8XCIM
	Σ FIC	0,61	1,125	0,35
	Interação	Aditiva	Indiferente	Sinérgica
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 23857	FIC antibiótico	1/8XCIM	1/8XCIM	1/8XCIM
	FIC EOFML	1XCIM	1/2X CIM	1/8XCIM
	Σ FIC	1,125	0,60	0,24
	Interação	Indiferente	Aditiva	Sinérgica

De acordo com a avaliação do tipo de interação antibiótico/extrato vegetal, pode-se observar sinergismo para EOFML e ampicilina para *S. aureus* (Figura 20), EOFML-AE e tetraciclina para *P. aeruginosa* (Figura 21) e EOFML e tetraciclina para *B. subtilis* (Figura 22). As demais interações foram aditivas ou indiferentes.

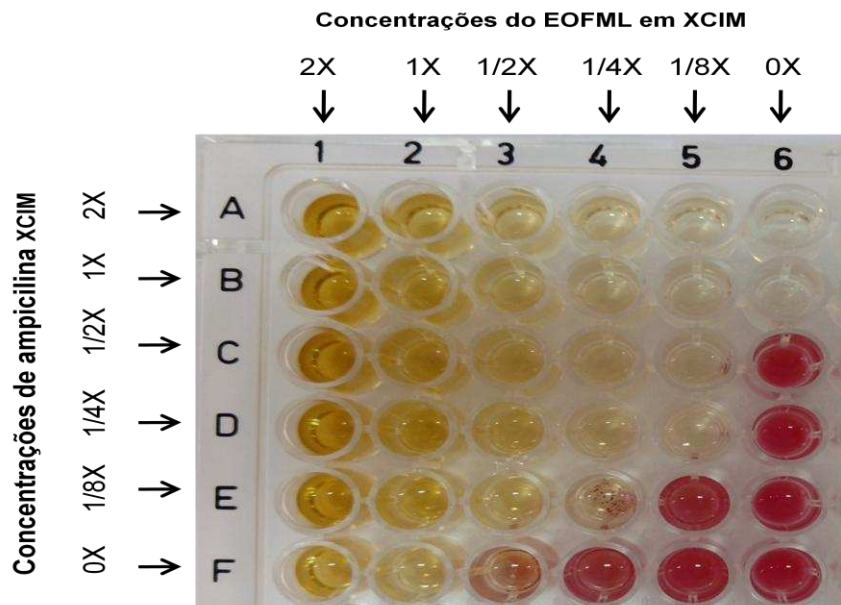


Figura 20: Interação sinérgica entre EOFML e ampicilina para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

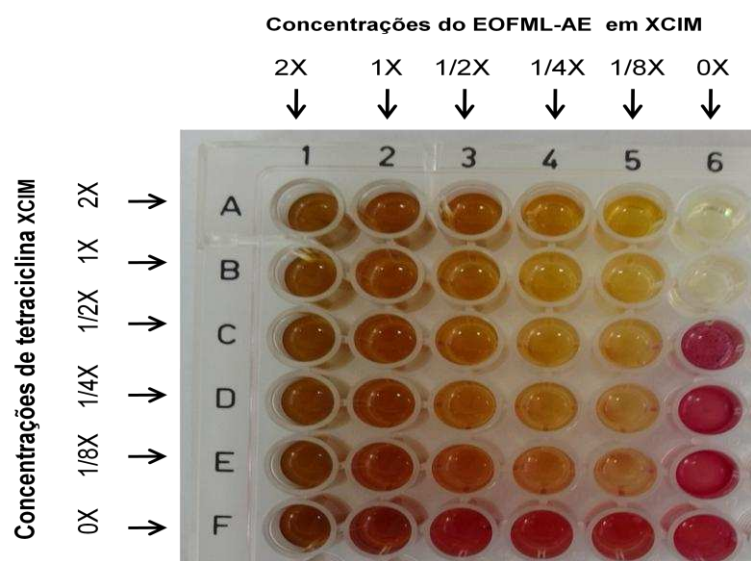


Figura 21: Interação sinérgica entre EOFML-AE e tetraciclina para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

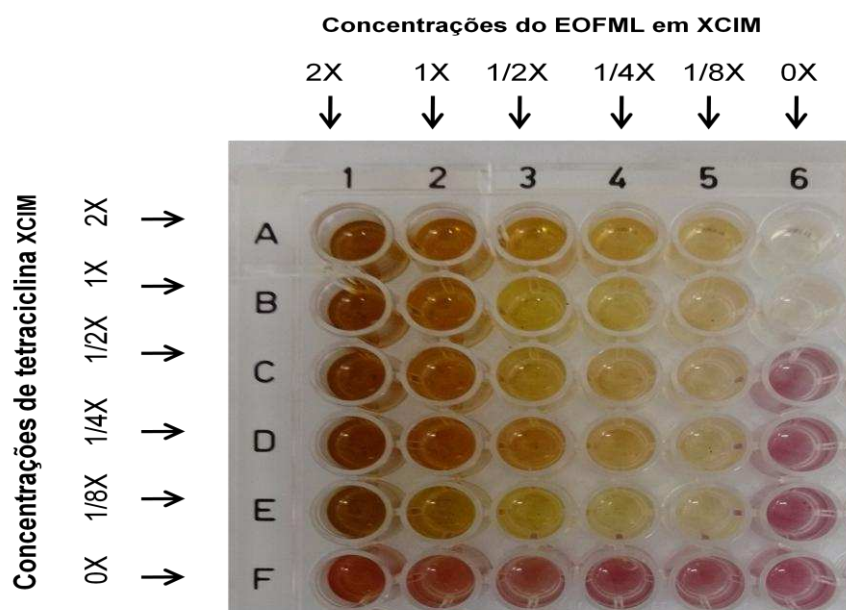


Figura 22: Interação sinérgica entre EOFML e tetraciclina para *Bacillus subtilis* ATCC 23857.

Patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* têm recebido uma atenção especial pelos pesquisadores, visto a ampla gama de infecções pelo qual são responsáveis e principalmente por cada vez mais serem resistentes aos antibióticos comerciais. As terapias de combinação sinérgica entre extratos vegetais e antibióticos comerciais têm mostrado um caminho para melhor resultado na clínica (MALONEY, 2016; USMAN et al., 2016).

A resistência adquirida pelas bactérias ocorre de três formas: seja por modificações do local ativo do antibiótico, resultando em redução na eficiência da ligação do fármaco, ou pela destruição direta e/ou modificação do antibiótico por enzimas produzidas pelo microorganismo, ou pelo efluxo do antibiótico da célula (AIYEGORO e OKOH, 2009). Os extratos vegetais possuem inibidores da resistência multidrogas modulando o desempenho de antibióticos sobre estirpes resistentes. Esses inibidores podem atuar na modificação do receptor ou sítio ativo, no aumento da penetração da droga, na diminuição do efluxo do antibiótico pela célula e impedindo a degradação enzimática ou modificação do antibiótico pela bactéria (HEMAISWARYA et al., 2008; AIYEGORO e OKOH, 2009).

Alguns metabólitos secundários como os polifenóis, triterpenos e flavonoides foram documentados em estudos por reverter a resistência de

bactérias a diversos antibióticos e por melhorarem a atividade dos antibióticos isoladamente ou através da mistura (AIYEGORO e OKOH, 2009).

A fração de acetato de etila do EOFML identificada por HPLC-UV-MS é enriquecida de flavonoides, sugerindo que esta classe de metabólito secundário seja a responsável pelo sinergismo observado.

Os flavonoides são um grupo de metabolitos secundários amplamente estudados quanto o seu potencial antibacteriano e, além de possuírem atividade antibiótica de forma isolada, vêm sendo pesquisados quanto ao uso em co-administração com antibióticos. Como exemplo, a quercetina, flavonoide identificado na fração de acetato de etila de *Miconia latecrenata*, demonstrou ação sinérgica em associação com ampicilina para infecção tópica causada por *Staphylococcus aureus* resistentes a ampicilina, assim como para rifampicina e outros (USMAN et al., 2016; LIN et al., 2008).

Estudos demonstram como a quercetina potencializa a ação do antibiótico. A quercetina, de modo isolado promoveu uma ligeira inibição da β -lactamase, mas quando associada à rifampicina, houve melhor efeito inibidor da β -lactamase. Ela também inibe a atividade catalítica de diferentes topoisomerasas bacterianas o que pode explicar a atividade sinérgica entre ela e a ciprofloxacina (BERNARD et al., 1997; LIN et al., 2008; DAGLIA, 2008).

Como visto na literatura, os flavonoides, como a quercetina, que já possui estudos avaliando o sinergismo, e que foi o flavonoide identificado no EOFML, pode contribuir com o aumento do potencial de ação dos antibióticos, visto que a espécie conseguiu reduzir a CIM da ampicilina de 30 $\mu\text{g/mL}$ para 3,75 $\mu\text{g/mL}$ em *S. aureus*, da tetraciclina de 30 $\mu\text{g/mL}$ para 3,75 $\mu\text{g/mL}$ em *P. aeruginosa* e de 3 $\mu\text{g/mL}$ para 0,37 $\mu\text{g/mL}$ em *B. subtilis*, sendo um produto natural promissor como novo antibiótico para ser utilizado em associação.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na triagem inicial, ao verificar o potencial antibacteriano dos 96 extratos de 24 espécies da BEL foram obtidos 37 extratos de 14 espécies com atividade contra a bactéria Gram-negativa, *P. aeruginosa*, e a Gram-positiva, *S. aureus*. Apenas três espécies apresentaram atividade antibacteriana para ambas as bactérias testadas, a saber, *Schinus terebintifolius*, *Miconia latecrenata*, *Eugenia florida*.

Dos 64 extratos vegetais testados sobre biofilme, nenhum conseguiu agir significativamente sobre biofilme pré-formado. No entanto, o extrato orgânico de folhas de *Syzygium jambos* e os extratos orgânicos de folhas e galhos de *Inga cylindrica* reduziram a formação de biofilme em 78,87%, 64,45% e 55,62%, respectivamente, demonstrando alto potencial antibiofilme.

No fracionamento biomonitorado do extrato orgânico de folhas de *Miconia latecrenata*, que se mostrou promissora pela triagem inicial para atividade antibacteriana, observou-se a predominância de compostos fenólicos, flavonoides e saponinas, estes dois últimos concentrados nas frações de acetato de etila, butanol e água, sendo saponinas ausentes na fração aquosa, comprovando a eficiência da partição líquido-líquido na separação das classes. Esses resultados foram confirmados tanto na prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada quanto pelo perfil cromatográfico em cromatografia de alta performance.

Ao realizar os testes biológicos com o EOFML e as frações constatou-se que a atividade antibacteriana estava concentrada nas frações mais polares, acetato de etila, butanol e água. A CIM das frações para *S. aureus* e *B. subtilis* manteve-se a mesma que a do EOFML, mas para *P. aeruginosa* a fração de acetato de etila diminuiu a CIM pela metade em relação ao extrato bruto demonstrando que a(s) molécula(s) responsável(is) pela atividade concentraram-se nessa fração e os interferentes foram eliminados.

Foi possível identificar por UPLC-UV-MS alguns metabólitos presentes na fração de acetato de etila, a saber, flavonoides quercetina, metoxiquercetina, derivado pentosídico de metoxiquercetina e quercetina-3-O-ramnosideo, podendo ser os responsáveis pela atividade antibacteriana.

O EOFML mostrou-se bacteriostático. Observou-se sinergismo entre EOFML e ampicilina ou tetraciclina para *S. aureus* e *B. subtilis*, respectivamente. O mesmo foi observado entre EOFML-AE e tetraciclina para *P. aeruginosa*.

Conclui-se que a pesquisa com produtos naturais na busca de novas moléculas antibióticas é promissora, uma vez que o EOFML mostrou resultados satisfatórios para dar prosseguimento ao estudo visando um produto novo para indústria farmacêutica, além de contribuir para o uso sustentável da biodiversidade agregando valor e reconhecimento dessa espécie vegetal pouco conhecida. As outras espécies vegetais que também apresentaram bons resultados, serão alvos de novas pesquisas fitoquímicas e biológicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIYEGORO, O. A.; OKOH, A. I. Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: implications in antimicrobial chemotherapy. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 13, p. 1147-1152, 2009.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; RAMOS, M. A.; JÚNIOR, W. S. F.; NASCIMENTO, A. L. B.; AVILEZ, W. M. T.; MELO, J. G. Are ethnopharmacological survey useful for the Discovery and development of drugs from medicinal plants? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 2, p. 101-115, 2014.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

ALMEIDA, A. A. **Bioprospecção de produtos naturais antitumorais em coleção de extratos de espécies arbóreas da Mata Atlântica**. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2015.

ÁSSIMOS, A. A. **Avaliação da concentração e dos tipos de flavonóides no própolis, utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração**. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2014.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; ROLLINGER, J. M. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

AWAN, A. R.; SHAW, W. M.; ELLIS, T. Biosynthesis of therapeutic natural products using synthetic biology. **Advanced drug delivery reviews**, v. 105, p. 96-106, 2016.

BASTOS, R. G.; ROSA, C. P.; OLIVER, J. C.; SILVA, N. C.; DIAS, A. L.; DA ROCHA, C. Q.; DA SILVA, M. A. Chemical characterization and antimicrobial activity of hydroethanolic crude extract of *Eugenia florida* dc (myrtaceae)

leaves. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 110-115, 2016.

BAZARGANI, M. M.; ROHLOFF, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. **Food Control**, v. 61, p. 156-164, 2016.

BERNARD, F.X.; SABLE, S.; CAMERON, B.; PROVOST, J.; DESNOTTES, J.F.; CROUZET, J.; BLANCHE, F. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 5, p. 992-998, 1997.

BLAIR, J. M.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BOERO, F. The study of species in the era of biodiversity: a tale of stupidity. **Diversity**, v. 2, n. 1, p. 115-126, 2010.

BORGES, A.; SAAVEDRA, M.J.; SIMÕES, M. Insights on antimicrobial resistance, biofilms and the use of phytochemicals as new antimicrobial agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 2590-2614, 2015.

BRASIL. LEI Nº 13.123, DE 20 DE MAIO DE 2015. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. **Diário Oficial da União**, 20.05.15.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. A convenção sobre diversidade biológica – CDB. **Cópia do Decreto Legislativo 2**, de 5 de junho de 1992. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2000.

BRIGHENTI, F. L.; SALVADOS, M. J.; DELBEM, A. C. B.; DELBEM, A. C. B.; OLIVEIRA, M. A. C.; SOARES, C. P.; FREITAS, L. S. F.; KOGA-ITO, C. Y. Systematic Screening of Plant Extracts from the Brazilian Pantanal with Antimicrobial Activity against Bacteria with Cariogenic Relevance Caries. **Caries Research**, v. 48, n. 5, p. 353-360, 2014.

BURGER, M. C.M.; TEREZAN, A. P.; DE OLIVEIRA CUNHA, G. S.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; MENEZES, A. C. S. Antimicrobial activity of the myrsinoic acid A from *Myrsine coriacea* and the semi-synthetic derivatives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 5, p. 451-454, 2015.

CADETE, R. M.; FONSECA, C.; ROSA, C.A. Novel Yeast Strains from Brazilian Biodiversity: Biotechnological Applications in Lignocellulose Conversion into Biofuels. **Springer International Publishing**, p. 255-259, 2014.

CAMARGO, L. R. P. **Avaliação da atividade antibacteriana de extratos vegetais de plantas brasileiras sobre *Escherichia coli***. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista, São Paulo, 2014.

CARVALHO, J. E. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. **Revista Multiciência**, 2006.

CHATTERJEE, S.; CHAKRABORTI, S. K. Antimicrobial activities of some antineoplastic and other withanolides. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 46, n. 1, p. 59-63, 1980.

CHAVEZ, P. C.; COPPO, E.; DI LORENZO, A.; GOZZINI, D.; BRACCO, F.; ZANONI, G.; DAGLIA, M. Chemical Characterization and in Vitro Antibacterial Activity of *Myrcianthes hallii* (O. Berg) McVaugh (Myrtaceae), a Traditional Plant Growing in Ecuador. **Materials**, v. 9, n. 6, p. 454, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standards. **CLSI Doc.** M07-A9. Wayne, PA, 9ed, 2012.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 72-79, 2005.

CUNHA, W. R.; MARTINS, C.; DA SILVA FERREIRA, D.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; ALBUQUERQUE, S. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. **Planta medica**, v. 69, n. 5, p. 470-472, 2003.

CUSHNIE, T. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

CUSHNIE, T. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v. 38, n. 2, p. 99-107, 2011.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174- 181, 2012.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 843-847, 2001.

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

DOS SANTOS, M. R. G.; DA SILVA, J. H. S.; CAXITO, M. L. D. C. Brief review on the medicinal uses and antimicrobial activity of different parts of *Schinus terebinthifolius* raddi. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 1-7, 2015.

DUEÑAS, M.; MINGO-CHORNET, H.; PÉREZ-ALONSO, J. J.; DI PAOLA-NARANJO, R.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M.; SANTOS-BUELGA, C. Preparation of quercetin glucuronides and characterization by HPLC–DAD–ESI/MS. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 4, p. 1069-1076, 2008.

EISENBERG, D.M.; HARRIS, E.S.; LITTLEFIELD, B.A.; CAO, S.; CRAYCROFT, J.A.; SCHOLTEN, R.; BAYLISS, P.; FU, Y.; WANG, W.; QIAO, Y.; ZHAO, Z.; CHEN, H.; LIU, Y.; KAPTCHUK, T.; HAHN, W.C.; WANG, X.; ROBERTS, T.; SHAMU, C.E.; CLARDY, J.. Developing a library of authenticated Traditional Chinese Medicinal (TCM) plants for systematic

biological evaluation--rationale, methods and preliminary results from a Sino-American collaboration. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 17-33, 2011.

EISENLOHR, P.V.; ALVES, L.F.; BERNACCI, L.C.; PADGURSCHI, M. C. G.; TORRES, R.B.; PRATA, B. E. M.; SANTOS, F. A. M.; ASSIS, M.A.; RAMOS, E.; ROCHELLE, A.L. Disturbances, elevation, topography and spatial proximity drive vegetation patterns along an altitudinal gradient of a top biodiversity hotspot. **Biodiversity and Conservation**, v. 22, n. 12, p. 2767-2783, 2013.

EUA. ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. National strategy for combating antibiotic-resistant bacteria. **The White house**. Washington, September, 2014.

EUROPA. Action Plan Against the rising threats from Antimicrobial Resistance: Road Map. ROAD MAP AMR **European Commission**, (updated 17/03/2015).

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA & INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais). Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1995–2000. **Fundação SOS Mata Atlântica e INPE**, São Paulo, 2001.

GOLDENBERG, R. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro – RJ, 2010.

GONTIJO, D. **Abordagem etológica na busca de drogas vegetais com potencial ação antioxidante, antibacteriana, antimutagênica e antigenotóxica**. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2012.

GONZÁLEZ, L. R.; MITCHELL, G.; GATTUSO, M.; DIARRA, M. S.; MALOUIN, F.; BOUARAB, K. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 8, p. 3400-3419, 2009.

GOODARZI, M.; RUSSELL, P. J.; VANDER HEYDEN, Y. Similarity analyses of chromatographic herbal fingerprints: a review. **Analytica chimica acta**, v. 804, p. 16-28, 2013.

HAQUE, M.; BEGUM, M. M.; HASAN, M.; RAHMAN, A. T.; HUSSAIN, M. I.; RAHMAN, M. M.; HASAN, C. M. Investigation of the medicinal potentials of *Syzygium jambos* (L.) extract and characterization of the isolated compounds. **American Journal of Bio Science**, v. 3, n 1-2, p. 12-18, 2015.

HARVEY, A.L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111-129, 2015.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

HERRMANN, J.; LUKEZIC, T.; KLING, A.; BAUMANN, S.; HUTTEL, S.; PETKOVIC, H.; MULLER, R. Strategies for the discovery and development of new antibiotics from natural products: three case studies. **Current Topics Microbiology and Immunology**, 2016.

HUSSAIN, T.; FATIMA, I.; RAFAY, M.; SHAHZAD, M. I.; ABDULLAH, M.; BANO, S.; RUBY, T. Comparison of Antibacterial Potential from Leaves and Fruits of Different Herbs and Shrubs of Family Solanaceae. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 17, n. 6, p. 1249-1254, 2015.

HUWAITAT, R.; MCCLOSKEY, A. P.; GILMORE, B. F.; LAVERTY, G. Potential strategies for the eradication of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Future Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 955-972, 2016.

JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; TABARELLI, M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives. **New Phytologist**, v. 204, n. 3, p. 459-473, 2014.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.

KHAFAGI, I.K.; DEWEDAR, A. The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. **Journal of Ethnopharmacologic**, v. 71, n. 3, p. 365-376, 2000.

KLEIN, R.C. **Caracterização molecular de estirpes de *Staphylococcus aureus* de mastite bovina e atividade anti-biofilme de uma lectina tipo c.** Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, 2014.

LEITE, J.P.V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas.** São Paulo: Atheneu, 2009, p. 328.

LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. **Síntese do conhecimento atual da biodiversidade brasileira.** In: LEWINSOHN, T.M. (org.). Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira. Brasília: MMA, v.1, p. 21-129, 2006.

LEWIS, K.; AUSUBEL, F. M. Prospects for plant-derived antibacterials. **Natural Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1504, 2006.

LIN, J. T.; CONNELLY, M. B.; AMOLO, C.; OTANI, S.; YAVAR, D. S. (2005). Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to treatment with subinhibitory concentrations of antibiotics that inhibit protein synthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1915-1926, 2005.

LIN, J.; NISHINO, K.; ROBERTS, M. C.; TOLMASKY, M.; AMINOV, R. I.; ZHANG, L. Mechanisms of antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 34, 2015.

LIN, R.D.; CHIN Y.P.; HOU W.C.; LEE M.H. The effects of antibiotics combined with natural polyphenols against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Planta Médica**, v. 74, n. 8, p. 840-846, 2008.

LING, L. L.; SCHNEIDER, T.; PEOPLES, A. J.; SPOERING, A. L.; ENGELS, I.; CONLON, B. P.; MUELLER, A.; SCHABERLE, T. F.; HUGHES, D. E.; EPSTEIN, S.; JONES, M.; LAZARIDES, L.; STEADMAN, V. A.; COHEN, D. R.; FELIX, C. R.; FETTERMAN, K. A.; MILLETT, W. P.; NITTI, A. G.; ZULLO, A. M.; CHEN, C.; LEWIS, K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, n. 75-35, 2015.

LOWELL, A. N.; SANTORO, N.; SWANEY, S. M.; MCQUADE, T. J.; SCHULTZ, P. J.; LARSEN, M. J.; SHERMAN, D. H. Microscale adaptation of in vitro transcription/translation for high throughput screening of natural product extract libraries. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 86, n. 6, p. 1331-1338, 2015.

MACEDO, M. L. R.; RIBEIRO, S. F.; TAVEIRA, G. B.; GOMES, V. M.; DE BARROS, K. M.; MARIA-NETO, S. (2016). Antimicrobial Activity of ILTI, a Kunitz-Type Trypsin Inhibitor from *Inga laurina* (SW.) Willd. **Current Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 538-544, 2016.

MACÍAS, V.; CUCA SUARÉZ, L.; COY BARRERA, E. Género Nectandra: "Fitoquímica y Actividad Biológica". **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14 ,n. 4, 2015.

MANNER, S.; SKOGMAN, M.; GOERES, D.; VUORELA, P.; FALLARERO, A. Systematic exploration of natural and synthetic flavonoids for the inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 19434-19451, 2013.

MCCLOUD, T.G. High throughput extraction of plant, marine and fungal specimens for preservation of biologically active molecules. **Molecules**, v. 15, n. 7, p. 4526-4563, 2010.

MEGDICHE-KSOURI, W.; TRABELSI, N.; MKADMINI, K.; BOURGOU, S.; NOUMI, A.; SNOUSSI, M.; KSOURI, R. (2015). *Artemisia campestris* phenolic compounds have antioxidant and antimicrobial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 104-113, 2015.

MESSIAS, K.L.S.; BUZZI, F.C.; FISHER, L.G.O; MALHEIROS, A.; MONACHE, F.D; CECHINEL FILHO, V. Chemical composition and analgesic of the leaves and branches of *Marlierea tomentosa* camb. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1747-1749, 2008.

MITCHELL, G.; LAFRANCE, M.; BOULANGER, S.; SÉGUIN, D. L.; GUAY, I.; GATTUSO, M.; MALOUIN, F. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 3, p. 559-

568, 2012.

MOLONEY, M. G. Natural Products as a Source for Novel Antibiotics. **Trends in pharmacological sciences**, v.37, n. 8, p. 689-701, 2016.

MONTALVO, L. C.; BOULOGNE, I.; GAVILLÁN-SUÁREZ, J. (2013). A screening for antimicrobial activities of Caribbean herbal remedies. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 126 ,2013.

MOTERIYA, P.; PADALIA, H.; RATHOD, T.; MENPARA, D.; CHANDA, S. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Maytenus emarginata* leaf and stem. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 4,p. 202-208, 2014.

MURUGAN, S.; UMA DEVI, P.; PARAMESWARI, N. K.; MANI, K. R. Antimicrobial activity of *Syzygium jambos* against selected human pathogens. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 44-47, 2011.

MYERS, N; MITTERMEIER, R.A.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

NEWMAN, D. J. The Influence of Brazilian Biodiversity on Searching for Human Use Pharmaceuticals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 3, p. 402-414, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

OOSTEN , M.V.; HAHN, M.; CRANE, L.M.A; PLEIJHUIS, R.G.; FRANCIS, K.P.; DIJIL, M.V; FEMS, G.M.D. Targeted imaging of bacterial infections: advances, hurdles and hopes. **Microbiology Reviews**, v. 39, n. 6, p. 892-916, 2015.

ORTÍZ-MARTINEZ, D. M.; RIVAS-MORALES, C.; DE LA GARZA-RAMOS, M. A.; VERDE-STAR, M. J.; NUÑEZ-GONZALEZ, M. A.; LEOS-RIVAS, C. *Miconia* sp. increases mRNA Levels of PPAR Gamma and Inhibits Alpha Amylase and

Alpha Glucosidase. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 512-519, 2016.

PAIS, V.A.A. **Evaluation of anticancer activity *in vivo* and *in vitro* of medicinal plants from “Serra da Mantiqueira Paulista”**. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2011.

PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibioticsusceptibility of drug resistant bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, n. 2, p. 164-168, 2010.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864-870, 2004.

PAOLILLO, R.; CARRATELLI, C. R.; RIZZO, A. Effect of resveratrol and quercetin in experimental infection by *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 2, p. 149-156, 2011.

PENESYAN, A.; GILLINGS, M.; PAULSEN, I.T. Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5286-5298, 2015.

PERROS, M. A sustainable model for antibiotics. **Science**, v. 347, n. 6226, p. 1062-1064, 2015.

PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 57-60, 2005.

PIMENTEL, V. P.; VIEIRA, V. A. M.; MITIDIERI, T. L.; OLIVEIRA, F. F. S.; PIERONI, J. P. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES**, n. 43, p. 41-89, 2015.

QUAVE, C. L.; ESTÉVEZ-CARMONA, M.; COMPADRE, C. M.; HOBBY, G.; HENDRICKSON, H.; BEENKEN, K. E.; SMELTZER, M. S. Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. **PLoSOne**, v. 7, n. 1, p. 28737, 2012.

RAJA, A.; LABONTE, J.; LEBBOS, J.; KIRKIPATRICK, P. Daptomycin. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 12, p. 943-944, 2003.

RENNER, S. S. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. **Nordic Journal of Botany**, v. 13, n. 5, p. 519-540, 1993.

RIBEIRO, M.C.; MARTENSEN, A.C.; METZGER, J.P.; TABARELLI, M.; SCARANO, F.; FORTIN, M.J. The Brazilian Atlantic Forest: A shrinking biodiversity hotspot. **Biodiversity Hotspots**, p. 405-434, 2011.

RODRIGUES, J.; MICHELIN, D. C.; RINALDO, D.; ZOCCOLO, G. J.; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial activity of *Miconia* species (Melastomataceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 1, p. 120-126, 2008.

RUSSELL, N. E.; PACHOREK, R. E. Clindamycin in the treatment of streptococcal and staphylococcal toxic shock syndromes. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 34, n. 7-8, p. 936-939, 2000.

SAMEEH, M. Y.; MOHAMED, A. A.; ELAZZAZY, A. M. Polyphenolic contents and antimicrobial activity of different extracts of *Padina boryana* Thivy and *Enteromorpha* sp marine algae. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 9, p. 87-92, 2016.

SANTOS, J. A. **Estudos das atividades antimicrobiana e anticâncer de *Erythroxyllum caatingae* Plowman e *Erythroxyllum subrotundum* A. St-Hil.** Tese de doutorado apresentada a Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2011.

SILVA, L. N.; TRENTIN, D. D. S.; ZIMMER, K. R.; TRETER, J.; BRANDELLI, C. L. C.; FRASSON, A. P.; MACEDO, A. J. Anti-infective effects of Brazilian

Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 3, p. 464-468, 2015.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES, A.J. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.

SILVA, S. L.; CHAAR, J. D. S.; DAMICO, D. C.; FIGUEIREDO, P. D. M.; YANO, T. Antimicrobial Activity of Ethanol Extract from Leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 5, p. 347-351, 2008.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonóides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1119-1128, 2009.

SILVER, L. L. A Gestalt approach to Gram-negative entry. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 24, p. 6379-6389, 2016.

SIMÕES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A.S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 6, p. 746-757, 2009.

SIQUEIRA, E. P.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L. Fingerprint of volatiles from plant extracts based on SPME-GC-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 565-571, 2007.

SKIRY CZ, A.; KIERSZNIOWSKA, S.; MÉRET, M.; WILLMITZER, L.; TZOTZOS, G. Medicinal Bioprospecting of the Amazon Rainforest: A Modern Eldorado? **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 781-790, 2016.

SOUZA, K. M.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S.; CASCAES, M. M.; SECCO, R. S.; BRASIL, D. S.; MULLER, A. H. Ricinine and other constituents of *Aparisthium cordatum* (Euphorbiaceae). **Natural Product Research**, v.27, n. 4-5, p. 364-370, 2013.

STROHL, W.R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **DDT**, v.5, n.2, p. 39, 2000.

SUFFREDINI, I. B.; SADER, H. S.; GONÇALVES, A. G.; REIS, A. O.; GALES, A. C.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest Brazilian. **Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 379-384, 2004.

TRIBESS, B.; PINTARELLI, G. M.; BINI, L. A.; CAMARGO, A.; FUNEZ, L. A.; GASPER, A. L.; ZENI, A. L. B. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 2015.

USMAN AMIN, M.; KHURRAM, M.; KHAN, T. A.; FAIDAH, H. S.; ULLAH SHAH, Z.; UR RAHMAN, S.; IRITI, M. Effects of Luteolin and Quercetin in Combination with Some Conventional Antibiotics against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 164, p. 136-146, 2016.

WENG, J.K.; PHILIPPE, R.N.; NOEL, J.P. The rise of chemodiversity in plants. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1667-1670, 2012.

WHO. World Health Organization. World Antibiotic Awareness Week. **Sign in:** <<http://www.who.int/mediacentre/events/2015>> Access: 10/18/15.

WILDER, M. A. Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana; 15o Suplemento Informativo. M100-S15. **Brasília, Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2005.

XIE, Y.; YANG, W.; TANG, F.; CHEN, X.; REN, L. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 132-149, 2015.

YADAV, S.K.; MISHRA, G.C. Biodiversity management open avenues for bioprospecting. **International Journal of Agriculture Food Science & Technology**, v. 4, n. 6, p. 635-642, 2013.

YANG, Y.; ZHANG, Z.; LI, S.; YE, X.; LI, X.; HE, K. Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. **Fitoterapia**, v. 92, p. 133-147, 2014.

YEDERY, R. D.; JERSE, A.E. Augmentation of Cationic Antimicrobial Peptide Production with Histone Deacetylase Inhibitors as a Novel Epigenetic Therapy for Bacterial Infections. **Antibiotics**, v. 4, n. 1, p. 44-61, 2015.