

ANA PAULA AGRIZZI

**BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADES
ANTICOLINESTERÁSICA E ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE PLANTAS
DA MATA ATLÂNTICA**

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

Orientador: João Paulo Viana Leite

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

A279b Agrizzi, Ana Paula, 1978-
2021 Bioprospecção de produtos naturais com atividades
anticolinesterásica e antibacteriana de extratos de plantas da Mata
Atlântica / Ana Paula Agrizzi. - Viçosa, MG, 2021.
70 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: João Paulo Viana Leite.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Inibidores de colinesterase. 2. Antibacterianos. 3. *Myrciaria strigipes*. 4. *Eugenia astringens*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 572.793

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fatima Alves CRB6 2578

ANA PAULA AGRIZZI

**BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADES
ANTICOLINESTERÁSICA E ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE PLANTAS
DA MATA ATLÂNTICA**

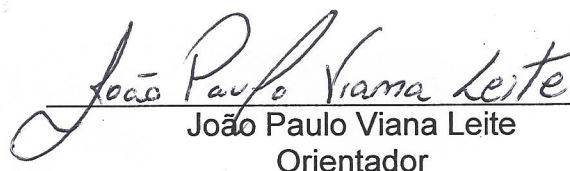
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 30 de abril de 2021.

Assentimento:



Ana Paula Agrizzi
Autora



João Paulo Viana Leite
Orientador

Ao meu marido Marcos e aos meus filhos Pedro e Ana Luiza por todo amor e companheirismo. Por terem compreendido meu desejo e apoiado minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Muitos foram os que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho, por isso, gostaria de manifestar minha gratidão...

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação em Bioquímica Aplicada;

Ao Prof. João Paulo Viana Leite, pela orientação dedicada, parceria e confiança;

À professora Andréa Ribon, pela coorientação e valiosas sugestões para o aprimoramento deste trabalho;

À Professora Andréia Q. Ribeiro, pela colaboração nas análises estatísticas;

Ao professor Eduardo V. Varejão, pelas análises em CG-EM;

À Letícia Monteiro Farias, pelo auxílio nas análises em HPLC-DAD;

Ao professor Marcelo dos Santos, pela parceria nos ensaios anticolinesterásicos, por ter aceito o convite para participar da banca examinadora e pelas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho;

Aos professores Tiago A. Mendes e Betânia B. Cota, por terem aceito o convite para participar da banca examinadora deste trabalho e pelas valiosas sugestões;

Aos amigos e amigas do Laboratório de Biodiversidade, pelos bons momentos. De forma especial, às amigas Iorrana V. Salustiano e Laís Rodrigues pela parceria generosa;

À Universidade Federal do Espírito Santo – Campus São Mateus, em especial ao Laboratório de Educação ambiental e ao Herbário-SAMES, pela logística nas expedições a campo, depósito de exsicatas e identificação das espécies vegetais.

Ao Parque Estadual de Itaúnas, membros administrativos e guardas-parque pela logística, transporte e auxílio nas expedições a campo;

Ao Instituto Estadual de Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos (IEMA) por terem concedido a autorização de pesquisa;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

*O correr da vida embrulha tudo,
a vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.*

João Guimarães Rosa

RESUMO

AGRIZZI, Ana Paula, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2021. **Bioprospecção de produtos naturais com atividades anticolinesterásica e antibacteriana de extratos de plantas da Mata Atlântica.** Orientador: João Paulo Viana Leite.

A rica biodiversidade vegetal da Mata Atlântica, associada a bioprospecção de produtos naturais, é uma importante fonte de novos compostos anticolinesterásicos e antibacterianos. Este trabalho teve como objetivo produzir uma coleção de extratos de espécies nativas do ecossistema de restinga, associado ao domínio Mata Atlântica, e avaliar seu potencial anticolinesterásico e antibacteriano. Em expedições ao Parque Estadual de Itaúnas-ES (PEI), foram coletadas folhas, galhos ou parte aérea (herbácea) de 30 espécies vegetais, distribuídas em 23 famílias botânicas. A partir do material vegetal pulverizado, foram produzidos os extratos empregando diferentes solventes extratores. A avaliação da atividade anticolinesterásica *in vitro* foi realizada a partir de ensaio de inibição das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) pelo método de Ellman com adaptações. Já a atividade antibacteriana *in vitro* foi avaliada pelo método de microdiluição contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Posteriormente, o extrato mais promissor para cada atividade foi submetido a fracionamento bio guiado pelo método de partição líquido-líquido (PLL) com solventes de diferentes polaridades. Prospeção fitoquímica dos extratos e das frações bioativas foi realizada por cromatografia em camada delgada usando padrões e reveladores específicos para cada classe de metabólitos secundários. *Fingerprint* da fração que apresentou maior percentual de inibição sobre a enzima AChE foi feita por HPLC-DAD. A identificação dos compostos antibacterianos presentes na fração mais ativa foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Os resultados indicaram o extrato metanólico de folhas de *Myrciaria strigipes* como o mais promissor na inibição de AChE e BChE. Após fracionamento, a fração em acetato de etila (EFMs), constituída por uma mistura de compostos flavonoídicos, foi a mais promissora, com inibição para AChE de 83% (400 µg/mL). O extrato em diclorometano-metanol (1:1, v/v) de folhas de *Eugenia astringens* (EBEa) foi o mais ativo contra a bactéria *S. aureus*. Após PLL, a fração hexânica (HFEa) obtida foi a que apresentou os menores valores de CIM contra seis bactérias do gênero *Staphylococcus*, incluindo a estirpe USA 300.

Interação sinérgica foi identificada entre EBEa ou HFEa e o antibiótico ofloxacina. Cinco compostos sesquiterpenos foram identificados em HFEa, sugerindo contribuir para a atividade antibacteriana apresentada. Os resultados apontam para um potencial anticolinesterásico de *M. strigipes* e antibacteriano de *E. astringens*. Ambas as espécies, pela primeira vez, são relatadas como fontes de produtos naturais bioativos para as atividades avaliadas. A continuidade na investigação é necessária para a completa identificação dos compostos ativos e a determinação de seus mecanismos de ação.

Palavras-chave: Atividade anticolinesterásica. Atividade antibacteriana. *Myrciaria strigipes*. *Eugenia astringens*.

ABSTRACT

Agrizzi, Ana Paula, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April 2021. **Bioprospecting of natural products with anticholinesterase and antibacterial activities from plant extracts from the Atlantic Forest.** Advisor: João Paulo Viana Leite.

The rich plant biodiversity of the Atlantic Forest, associated with bioprospecting of natural products, is an important source of new anticholinesterase and antibacterial compounds. This work aimed to produce a collection of extracts of native species from the restinga ecosystem, associated with the Atlantic Forest domain, and to evaluate its anticholinesterase and antibacterial potential. In expeditions to the State Park of Itaúnas-ES (PEI), leaves, branches or aerial part (herbaceous) of 30 plant species were collected, distributed in 23 botanical families. From the pulverized plant material, extracts were produced using different extracting solvents. The evaluation of anticholinesterase activity in vitro was carried out from the inhibition assay of the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) by the Ellman method with adaptations. The antibacterial activity in vitro was evaluated by the microdilution method against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Subsequently, the most promising extract for each activity was subjected to bioguided fractionation by the liquid-liquid partition (PLL) method with solvents of different polarities. Phytochemical prospecting of extracts and bioactive fractions was performed by thin layer chromatography using specific patterns and developers for each class of secondary metabolites. Fingerprint of the fraction that showed the highest percentage of inhibition on the enzyme AChE was made by HPLC-DAD. The identification of antibacterial compounds present in the most active fraction was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-EM). The results indicated the methanolic extract of leaves of *Myrciaria strigipes* as the most promising in the inhibition of AChE and BChE. After fractionation, the fraction in ethyl acetate (EFMs), consisting of a mixture of flavonoid compounds, was the most promising, with 83% inhibition for AChE (400 µg / mL). The extract in dichloromethane-methanol (1: 1, v / v) from leaves of *Eugenia astringens* (EBEa) was the most active against the bacterium *S. aureus*. After PLL, the hexane fraction (HFEa) obtained was the one with the lowest MIC values against six bacteria of the *Staphylococcus* genus, including the strain USA 300. Synergistic interaction was identified between EBEa or

HFEa and the antibiotic ofloxacin. Five sesquiterpene compounds were identified in HFEa, suggesting that they contribute to the antibacterial activity presented. The results point to an anticholinesterase potential of *M. strigipes* and antibacterial of *E. astringens*. Both species, for the first time, are reported as sources of bioactive natural products for the activities evaluated. Continuity in the investigation is necessary for the complete identification of the active compounds and the determination of their mechanisms of action.

Keywords: Anticholinesterase activity. Antibacterial activity. *Myrciaria strigipes*, *Eugenia astringens*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – ARTIGO I

Figura 1 – Gráfico de dispersão do percentual de inibição da AChE e BChE obtida para os 114 extratos avaliados.....34

Figura 2 – A) Perfil cromatográfico por HPLC-DAD (254 nm) da fração EFMs obtida na partição líquido-líquido do extrato metanólico de folhas de *M. strigipes*. B) Espectros UV-Visível dos picos 1 a 12 do cromatograma.....37

CAPÍTULO 2 – ARTIGO II

Figura 1 – Cromatograma de íons totais da fração FHEa obtido por CG-EM.....58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – ARTIGO I

- Tabela 1** – Gradiente de eluição empregado na análise da fração EFMs por HPLC-DAD.....29
- Tabela 2** – Porcentagem de inibição das enzimas AChE e BChE de 114 extratos de 30 espécies vegetais na concentração final de 400 µg/mL.....29
- Tabela 3** – Rendimento das frações resultantes do fracionamento do extrato metanólico de folhas de *M. strigipes* (1,0 g) por HPLC-DAD.....35
- Tabela 4** – Prospecção fitoquímica do extrato de folhas de *M. strigipes* e das frações obtidas por PLL35
- Tabela 5** – Porcentagem de inibição da AChE e BChE pelas frações obtidas na PLL na concentração final de 400µg/mL.....36

CAPÍTULO 2 – ARTIGO II

- Tabela 1** – Triagem da atividade antibacteriana dos extratos vegetais frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.....53
- Tabela 2** – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos vegetais frente a *S. aureus* ATCC 29213.....54
- Tabela 3** – Prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada do extrato e frações de folhas de *E. astringens*.....56
- Tabela 4** – Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato e frações de *E. astringens* frente a bactérias *Staphylococcus*.....57
- Tabela 5** – Constituintes químicos identificados por CG-EM da Fração HFEa.....59
- Tabela 6** - Avaliação do tipo de interação entre EBEa ou FHEa com antibióticos sobre MRSA USA 300.....60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ATCC – *American Type Culture Collection*

BChE – Butirilcolinesterase

BHI – Brain Heart Infusion

CCD – Cromatografia em camada delgada

DA – Doença de Alzheimer

DCM – Diclorometano

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPR – Desvio padrão relativo

DTNB – 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico)

HPLC-DAD – *High performance liquid chromatography - Diode Array Aetection*

IEMA – Instituto Estadual de Meio Ambiente

INT – cloreto de iodonitrotetrazólio

MeOH – Metanol

MH – Müller-Hilton

CIM – Concentração Inibitória mínima

PEI – Parque Estadual de Itaúnas

PLL – Partição Líquido-Líquido

UFC – Unidade formadora de colônia

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
OBJETIVOS.....	20
Objetivo Geral	20
Objetivos Específicos.....	20
Capítulo 1 – ARTIGO I	
BIOPROSPECÇÃO EM ESPÉCIES VEGETAIS DA MATA ATLÂNTICA INDICA <i>Myrciaria strigipes</i> O. Berg (MYRTACEAE) COMO FONTE DE COMPOSTOS ANTICOLINESTERÁSICOS	22
2 MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1 Material vegetal.....	24
2.2 Produção dos extratos vegetais	24
2.3 Ensaio anticolinesterásico <i>in vitro</i>	26
2.4 Análise de Correlação.....	27
2.5 Fracionamento bioguiado do extrato metanólico de <i>Myrciaria strigipes</i> ..	27
2.6 <i>Fingerprint</i> da fração mais ativa de <i>Myrciaria strigipes</i>	28
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1 Avaliação da inibição das enzimas AChE e BChE.....	29
3.2 Análise de Correlação.....	33
Figura 1 – Gráfico de dispersão do percentual de inibição da AChE e BChE obtida para os 114 extratos avaliados.....	34
3.3 Fracionamento biomonitorado e prospecção fitoquímica.....	34
3.4 Avaliação da inibição de AChE pelas frações da PLL.....	35
3.5 <i>Fingerprint</i> do extrato e fração em acetato de etila de <i>Myrciaria strigipes</i>	36
4 CONCLUSÕES	38
AGRADECIMENTOS	38
CONFLITO DE INTERESSES	39
REFERENCIAS.....	40
Capítulo – ARTIGO II	
TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA IN VITRO DE PLANTAS DA MATA ATLÂNTICA INDICA <i>Eugenia astringens</i> Cambess (MYRTACEAE) COMO FONTE DE COMPOSTOS SESQUITERPENICOS ANTIBACTERIANOS.....	45
Resumo	45

1 INTRODUÇÃO	46
2 MATERIAIS E MÉTODOS	47
2.1 Material vegetal e preparação de extratos	47
2.2 Fracionamento do extrato de <i>Eugenia astringens</i>	48
2.3 Prospecção fitoquímica do extrato bioativo e frações	49
2.4 Microrganismos e condições de cultura	49
2.5 Triagem antibacteriana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	50
2.6 Análise de Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massas	51
2.7 Ensaio de sinergismo	51
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1 Triagem da atividade antibacteriana dos extratos	52
3.2 Fracionamento bio guiado e prospecção fitoquímica de <i>Eugenia astringens</i>	55
3.3 Determinação da CIM do extrato e frações de <i>Eugenia astringens</i>	56
3.4 Caracterização química da fração FHEa por CG-EM	58
3.5 Análise da interação do extrato ou fração hexânica com antibióticos	60
4 CONCLUSÕES	61
AGRADECIMENTOS	61
CONFLITO DE INTERESSES	62
REFERENCIAS	62
CONCLUSÃO GERAL	67
ANEXOS	68
Anexo 1 – Autorização de pesquisa concedida pelo Instituto Estadual do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos (IEMA-ES).....	68
Anexo 2 – Comprovante de cadastro de acesso ao patrimônio genético junto ao Sistema Nacional do Patrimônio Genético e do Conhecimento tradicional Associado (SisGen).....	69

INTRODUÇÃO GERAL

Há séculos os conhecimentos sobre as propriedades curativas das plantas têm sido usados para tratar e prevenir diversas doenças. Geralmente os responsáveis pelas propriedades biológicas das espécies vegetais são compostos ativos produzidos durante o metabolismo vegetal secundário. Utilizados para diversos fins, esses compostos são alvos de pesquisas e tem garantido o tratamento de várias doenças, atuando, por exemplo, na terapia contra doenças neurodegenerativas e como agentes antibacterianos, antifúngicos e antitumorais (Newman, 2016). Aliado a isso, a manutenção do interesse em investigar espécies vegetais como fontes de substâncias bioativas, decorre de características peculiares desses compostos, com destaque para sua diversidade química, alta complexidade estrutural e refinado mecanismo de ação, pelos quais as moléculas exercem seus efeitos (Shu, 1998).

O Brasil representa uma das mais ricas fontes de novos medicamentos e outros produtos biotecnológicos, pois é o detentor da maior diversidade vegetal do planeta. No entanto, apesar de toda essa biodiversidade, com mais de 55 mil espécies vegetais descritas, dispõe de poucas pesquisas sobre o potencial destas espécies (Calixto, 2003). Dentre as plantas superiores identificadas em todo o mundo, estima-se que menos de 10% possuem estudos fitoquímicos detalhados ou foram investigadas quanto ao potencial biológico (Zhang, 2002; McCloud, 2010, Eisenberg et al., 2011).

A Mata Atlântica pode ser definida como um bioma tropical extremamente heterogêneo, que engloba diversos tipos de vegetação e ecossistemas associados como as restingas, além de mangues e campos de altitude (Guedes-Bruni, 1998). Presente em 17 estados brasileiros, incluindo todos os estados do sul e sudeste, o bioma tem uma importância vital para cerca de 120 milhões de brasileiros que vivem em seus domínios; onde são gerados aproximadamente 70% do PIB brasileiro (ICMBio).

Considerada um *hotspot* mundial, a Mata Atlântica abriga uma rica biodiversidade, porém muito devastada por ações antrópicas, como a exploração do pau-brasil, mineração e o ciclo do café. Mais recentemente, a Mata Atlântica vem sendo reduzida devido à ocupação demográfica das áreas urbanas das grandes cidades. Hoje, as suas áreas remanescentes de vegetação nativa estão reduzidas a aproximadamente de 12,4% de sua cobertura original (SOS Mata Atlântica & INPE, 2019).

Ainda há muito a ser descoberto no que se refere ao potencial terapêutico das espécies vegetais do bioma Mata Atlântica, em especial do ecossistema de restinga. Desta forma, é urgente o desenvolvimento de metodologias para pesquisas de produtos bioativos da biodiversidade que sejam compatíveis com o manejo sustentável de espécies nativas deste bioma (Yadav e Mishra, 2013). Neste sentido, a bioprospecção é uma excelente estratégia para exploração sustentável da biodiversidade na busca por novos produtos naturais com valor econômico, social e ambiental agregado (Simões et al., 2009).

A presente tese trata da produção de uma coleção de extratos de espécies nativas do ecossistema de restinga, associado ao bioma Mata Atlântica, e da investigação do potencial anticolinesterásico e antibacteriano dessas espécies.

As colinesterases (ChEs), acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), são enzimas que catalisam a hidrólise da acetilcolina (ACh) e a consequente repolarização dos neurônios. No entanto, pacientes com doença de Alzheimer (DA) apresentam baixa concentração de ACh e a degradação deste neurotransmissor pela ação das ChEs, acaba diminuindo ainda mais sua disponibilidade no sistema nervoso central (Heinrich; Teoh, 2004). Por conseguinte, entre as drogas atualmente empregadas no tratamento da DA, destaca-se o uso de substâncias cuja ação aumenta a função colinérgica central, aumentando os níveis de acetilcolina no cérebro através da inibição das colinesterases. Esses inibidores representam uma importante estratégia no tratamento sintomático da doença, melhorando os aspectos cognitivos, apesar de não impedirem o avanço da doença (Chaves; Aversi-Ferreira, 2008; Kim et al., 2010).

Dentre os compostos naturais que atuam inibindo as ChEs, destacam os alcaloides, primeiras moléculas utilizadas como agentes terapêuticos no tratamento da DA, sendo a classe de produtos naturais mais promissoras (De Falco et al., 2016).

A busca por novos agentes antibacterianos justifica-se pelas doenças infecciosas representarem uma importante causa de morbidade e mortalidade entre a população em geral, particularmente nos países em desenvolvimento. Devido à resistência bacteriana a antibióticos, problema considerado de saúde pública, vários países têm se mobilizado no sentido de diminuir a mortalidade por infecções bacterianas multirresistentes (Who, 2015; Blair et al., 2015).

No século passado, por muitos anos o aumento na resistência dos microrganismos foi combatido pela descoberta de novos agentes antimicrobianos.

Entretanto, nas últimas décadas, o uso indiscriminado de antibióticos fez com que a resistência das bactérias crescesse imensamente. No entanto, houve uma diminuição considerável do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, agravando o problema (Livermore, 2011; Lakemeyer et al., 2018).

A necessidade da descoberta de novas alternativas terapêuticas frente ao aumento da resistência dos microrganismos aos fármacos disponíveis, tem provocado uma grande corrida na busca por eficientes agentes antimicrobianos, sejam de origem natural, semissintética ou sintética (Silveira et al., 2006).

No presente trabalho, a avaliação da atividade anticolinesterásica foi realizada por ensaios *in vitro* de inibição das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). Já a avaliação da atividade antibacteriana foi realizada sobre diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas causadoras de importantes infecções humanas e veterinárias.

Os estudos realizados estão descritos em dois capítulos. O primeiro capítulo traz um artigo intitulado “Bioprospecção em espécies vegetais da Mata Atlântica indica *Myrciaria strigipes* O. Berg (Myrtaceae) como fonte de compostos anticolinesterásicos”; o segundo capítulo apresenta o artigo intitulado “Triagem da atividade antibacteriana *in vitro* de plantas da Mata Atlântica indica *Eugenia astringens* Cambess como fonte de compostos sesquiterpênicos antibacterianos”. Em ambos os artigos são descritas detalhadamente as etapas do fracionamento biomonitorado, ensaios biológicos e técnicas utilizadas para a identificação dos compostos presentes nas frações mais ativas.

REFERÊNCIAS

BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V.; Molecular Mechanisms of antibiotic resistance. Nat. Ver. Microbiol., v. 13(1), p. 42-51, 2015.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. Cienc. Cult. [online], vol.55, n.3, p.37-39, 2003

CHAVES, M. B.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Terapia Medicamentosa da Doença de Alzheimer. Revista eletrônica de Farmácia, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2008. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/articte/view/4608/3931>. Acesso em: 13 jun. 2019.

DE FALCO, A.; CUKIERMAN, D.S.; HAUSER-DAVIS, R.A.; REY, N.A. Alzheimer's disease: etiological hypotheses and treatment perspectives. *Química Nova*, [S.l.]. GN1 Genesis Network. doi: 10.5935/0100-4042.20150152, v. 39, n. 1, p.63-80, 2016.

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*, 82, p. 17-33, 2011.

GUEDES-BRUNI, R. R. Composição, estrutura e similaridade florística de dossel em seis unidades de Mata Atlântica no Rio de Janeiro. 1998. 231f. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

HEINRICH, M.; TEOH, H. L. Galanthamine from snowdrop – the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 92, p. 147-162, 2004.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio) – Ministério do Meio Ambiente. Mata Atlântica, Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomas-brasileitos/mata-atlantica>, Acesso em: 26/06/2020.

KIM, J.; Lee, H.J.; Lee, K.W. Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 112, p. 1415–1430, 2010.

LAKEMEYER, M.; ZHAO, W.; MANDL, F. A.; HAMMANN, P.; SIEBER, S. A. Thinking outside the box - novel antibacterials to tackle the resistance crisis. *Angewandte Chemie*, v. 30, p. 14642-14682, 2018.

LIVEMORE, D. M. Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 66, n. 9, p. 1941-1944, 2011.

MCCLOUD, T. G. High Throughput Extraction of Plant, Marine and Fungal Specimens for Preservation of Biologically Active Molecules. *Molecules*, v.15, p. 4526-4563; doi:10.3390/molecules15074526, 2010.

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.

SHU, Y.Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, 61, p. 1053-1071, 1998.

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

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.

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.

SOS MATA ATLÂNTICA e INPE. Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata
WHO - World Health Organization World. Antibiotic Awareness Week. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/events/2015>> Acesso: 22/11/20.

YADAV, S. K.; MISHRA, G. C. Biodiversity Management Open Avenues for Bioprospecting. *International Journal of Agriculture Food Science & Technology*. 4 (6), p. 635-642, 2013.

ZHANG, J.T. New Drugs Derived from Medicinal Plants. *Therapie* 57(2), p. 137-50, 2002.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar a presença de metabólitos secundários com atividade anticolinesterásica e antibacteriana em extratos de plantas da Mata Atlântica.

Objetivos Específicos

- ✓ Produzir uma coleção de extratos de espécies vegetais nativas do ecossistema de restinga, associado ao domínio Mata Atlântica;
- ✓ Avaliar, *in vitro*, a presença de inibidores das colinesterases acetilcolinesterase e butirilcolinesterase em extratos da coleção;
- ✓ Avaliar a correlação entre a inibição da enzima acetilcolinesterase e butirilcolinesterase pelos extratos;
- ✓ Avaliar, *in vitro*, a atividade antibacteriana dos extratos da coleção;
- ✓ Selecionar o extrato ativo mais promissor (atividade anticolinesterásica e antibacteriana) para fracionamento bioquímico e estudo fitoquímico;
- ✓ Avaliar as atividades anticolinesterásica e antibacteriana das frações bioativas obtidas;
- ✓ Avaliar a interação do extrato e da fração antibacteriana mais promissora com antibióticos utilizados na clínica médica;
- ✓ Identificar os metabólitos secundários presentes nas frações bioativas.

Capítulo 1 – Artigo I

BIOPROSPECÇÃO EM ESPÉCIES VEGETAIS DA MATA ATLÂNTICA INDICA *Myrciaria strigipes* O. Berg (MYRTACEAE) COMO FONTE DE COMPOSTOS ANTICOLINESTERÁSICOS

Ana Paula Agrizzi^a, Iorrana Vieira Salustiano^a, Laís Azevedo Rodrigues^a, Leticia Monteiro Farias^a, Andreia Queiroz Ribeiro^b, João Paulo Viana Leite^a

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Brazil.

^b Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

* Corresponding author: agrizzianapaula@gmail.com, jpvlite@ufv.br

Resumo: A bioprospecção de compostos vegetais destaca-se como uma importante estratégia para a descoberta de novos produtos naturais com potencial anticolinesterásico. Os inibidores de colinesterases podem ser usados no tratamento de diferentes doenças neurodegenerativas e também como inseticidas. Este trabalho teve como objetivo prospectar produtos naturais oriundos de espécies nativas da Mata Atlântica com atividade anticolinesterásica. Foram coletadas folhas, galhos ou parte aérea (herbáceas) de 30 espécies vegetais, resultando na produção de 114 extratos. A avaliação da atividade inibitória para acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) foi realizada em microplaca de 96 poços pelo método de Ellman. O extrato mais promissor foi selecionado para o fracionamento bioguiado e submetido a prospecção fitoquímica. O extrato metanólico das folhas de *Myrciaria strigipes* (8FM) apresentou o maior percentual de inibição para ambas as enzimas, sendo de 74,9% para a enzima AChE e em 71,7% para BChE, na concentração de 400 µg/mL. Observou-se correlação positiva de moderada a forte entre o percentual de inibição de AChE e o percentual de inibição de BChE ($r = 0,70$; $p < 0,01$). Dentre as frações obtidas a partir desse extrato, a fração em acetato de etila (EFMs) destacou-se pelo aumento de atividade, com inibição para a AChE de 83% (400 µg/mL). Análise por HPLC-DAD sugere que os compostos ativos presentes em EFMs pertencem majoritariamente a classe dos flavonoides. Os resultados indicam que a espécie *M. strigipes*, apesar de ainda ser pouco conhecida da ciência, é uma promissora fonte de produtos naturais com ação inibidora de colinesterases.

Palavras-chaves: Inibidores de colinesterases, *Myrciaria strigipes*, Mata Atlântica, doença de Alzheimer, inseticida, produtos naturais.

1 INTRODUÇÃO

A principal estratégia no tratamento da doença de Alzheimer (DA) e outras doenças neurodegenerativas e, mais recentemente, na terapia contra miastenia gravis é o uso de inibidores de colinesterases (Pohanka, 2014). Além disso, como a acetilcolinesterase (AChE) é expressa em todos os invertebrados, sendo uma enzima

fundamental no sistema colinérgico, tem sido um importante alvo para o desenvolvimento de inseticidas (Lang; Zhu; Zhang, 2012). Dessa forma, a investigação de novos agentes inibidores de AChE, seja para fins terapêuticos ou para fins agrônômicos, tem atraído grande interesse científico.

As enzimas AChE e BChE hidrolisam o neurotransmissor acetilcolina (ACh) repolarizando o neurônio colinérgico. Inibidores que atuam sobre AChE, ou que inibem também a BChE, aumentam os níveis de acetilcolina no cérebro de pacientes em tratamento, o que atenua os sintomas da DA e outras demências, em especial melhorando os aspectos cognitivos (Chaves; Aversi-Ferreira, 2008; Kim; Lee; Lee, 2010; Leblhuber et al., 2018). Já com relação a ação inseticida, a hiper estimulação do sistema nervoso do inseto-alvo é o que ocasiona sua morte (Lang; Zhu; Zhang, 2012).

A biodiversidade brasileira, em especial a do bioma Mata Atlântica, representa uma importante fonte de novos produtos naturais, que podem ser utilizados na terapia contra diferentes doenças (Newman, 2016). No entanto, apesar de abrigar cerca de 20 % de toda biodiversidade mundial, o Brasil contribui com apenas 1,5% do total da produção científica no contexto da diversidade biológica (Myers et al., 2000; Joly; Metzger; Tabarelli, 2014).

A bioprospecção pode ser definida como uma estratégia na busca sistemática por compostos com potencial econômico e que podem levar ao desenvolvimento de um produto (Saccaro Júnior, 2011). Nesse contexto, a produção de uma coleção de extratos para bioprospecção de espécies vegetais tem se mostrado eficaz na descoberta de novos insumos farmacêuticos ativos (Lowell et al., 2015). Pesquisas conduzidas pelo Departamento de Produtos naturais do Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos, a partir de uma coleção de extratos, possibilitaram a descoberta de importantes compostos antitumorais, como o taxol (McCloud, 2010).

Na terapia da doença de Alzheimer, metabólitos secundários obtidos de plantas, em especial os alcaloides, estão entre os primeiros inibidores de colinesterases descobertos. No entanto, existem relatos de inibidores de outras classes de metabólitos, incluindo flavonoides, terpenoides, esteróis e compostos fenólicos (Boonyaketguson et al., 2018; Huang et al., 2013; Jung et al., 2011; Orhan et al., 2009). A ampliação da compreensão sobre a DA, indica uma tendência de investir em compostos com múltiplos alvos. Nesse contexto, os produtos naturais

destacam-se, já que podem apresentar um vantajoso multi-direcionamento de mecanismo de ação (Ballatore et al., 2007; Russo et al., 2013; Zhang et al., 2019).

Apesar de vários produtos naturais terem sido estudados, apenas uma pequena porcentagem atinge o estágio de ensaios clínicos (Butler; Robertson; Cooper, 2014; Asha, 2017). Os inibidores atualmente disponíveis para tratamento da DA, como a galantamina, donepezil e rivastigmina, encontram-se em número limitado e apresentam diferentes efeitos colaterais (Pohanka, 2014; De Falco et al., 2016; Cummings; Tong; Ballard, 2019). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo empregar uma coleção de extratos vegetais de plantas da Mata Atlântica para a busca de novos agentes inibidores das enzimas AChE e BChE.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O acesso às plantas para produção dos extratos vegetais foi realizado de forma randômica, concentrando-se no ecossistema de restinga, que integra o bioma Mata Atlântica do Parque Estadual de Itaúnas (PEI). O PEI está localizado no distrito de Itaúnas, município de Conceição da Barra, litoral norte do estado do Espírito Santo (Latitude: 18° 25'5.97" S - Longitude 39° 42'25.68" O). O acesso ao material vegetal foi autorizado pelo Instituto Estadual de Meio Ambiente e dos Recursos hídricos (IEMA). O acesso ao patrimônio genético foi também cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos (Cadastro nº A381FA0).

Foram coletados folhas e galhos de espécies vegetais de porte arbóreo e arbustivo, e parte aérea das plantas herbáceas. Cada espécie acessada foi georreferenciada, identificada e sua exsicata depositada no Herbário SAMES da Universidade Federal do Espírito Santo campus São Mateus (UFES).

2.2 Produção dos extratos vegetais

Para produção dos extratos vegetais foi utilizado o método de maceração seguindo protocolo indicado por McCloud (2010) e adaptado por Almeida et al. (2020).

Folhas, galhos e parte aérea das espécies coletadas foram desidratadas em estufa de ventilação forçada a temperatura constante de 40° C por 48 horas. O material desidratado obtido foi pulverizado em moinho de facas, pesado e depositado em um recipiente de aço inox, onde foram adicionados solventes extratores na proporção 1:5 (m/v). Na primeira etapa de extração, utilizou-se uma mistura dos solventes diclorometano (DCM) e metanol (MeOH), na proporção de 1:1 (v/v), permanecendo em contato com a droga vegetal por aproximadamente 15 horas. Após esse intervalo, o extrato foi drenado e levado a secagem empregando evaporador rotativo à vácuo. A torta remanescente foi submetida a uma segunda extração com MeOH por 15 horas. O extrato metanólico obtido foi drenado e o solvente evaporado até obtenção do extrato seco. Desta forma, para as espécies arbóreas e arbustivas foram obtidos quatro extratos, sendo: dois extratos de diferentes polaridades de folhas e dois de galhos. Já para as plantas herbáceas, onde toda a parte aérea foi pulverizada, apenas dois extratos foram produzidos. Posteriormente, todos os extratos foram liofilizados e armazenados em freezer a - 20° C, passando a compor a coleção *BIOPROS Extracts Library*.

2.3 Ensaio anticolinesterásico *in vitro*

Todos os 114 extratos produzidos e as frações resultantes do fracionamento bioguiado foram submetidos ao ensaio de inibição das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE).

A inibição da atividade enzimática das colinesterases foi determinada por ensaio espectrofotométrico em microplaca de 96 poços (polietileno, Kasvi®), seguindo metodologia descrita por Ellman et al. (1961) com modificações. Os extratos produzidos foram solubilizados em metanol na concentração de 20mg/mL. Para aprimorar a diluição destas amostras, utilizou-se o banho ultrassônico por 15 min em temperatura de 30°C. Estes extratos foram avaliados quanto ao seu potencial de inibir a atividade das colinesterases AChE e BChE. Nos ensaios, foi utilizada a enzima AChE de enguia elétrica (*Electrophorus electricus*) tipo VI e BChE de soro equino e seus respectivos substratos, iodeto de acetiltiocolina e cloreto de butiriltiocolina (Sigma-Aldrich®). Em cada poço da microplaca foram adicionados 25µL de substrato das colinesterases, 125 µL da mistura reacional (ácido 5,5' - ditio-bis 2-nitrobenzoico - DTNB), 50 µL de tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0, contendo 0,1% de Albumina Sérica Bovina (BSA) e 25µL de extratos/frações das plantas, de forma a alcançar a concentração final de 400 µg/mL. Tampão Tris-HCl acrescido de metanol (20%) foram usados como controle negativo e fisostigmina (17 mM) como inibidor padrão.

As leituras das microplacas foram realizadas em leitor Thermoplate, modelo TP-reader, em temperatura constante de 30°C, sendo a absorbância medida em comprimento de onda de 405 nm. Após uma leitura inicial da microplaca, importante para se descontar a absorbância dos extratos, foram adicionados em cada poço 25 µL da enzima correspondente ao ensaio. Ambas as enzimas (AChE e BChE) foram utilizadas no ensaio na concentração de 0,2 U/mL⁻¹. Após a adição da enzima, a placa foi imediatamente levada ao leitor onde as leituras foram realizadas a cada cinco minutos em um intervalo total de 20 min. A inibição da hidrólise enzimática foi avaliada a partir da diferença de valores de absorbância obtidos nas leituras sem e com a adição da enzima.

Assim, a porcentagem de inibição foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra} \times 100}{\text{Absorbância do controle}}$$

Todos os ensaios foram realizados em três réplicas biológicas. Foram definidos como promissores os extratos que obtiveram média da porcentagem de inibição da atividade anticolinesterásica superior a 50%.

2.4 Análise de Correlação

Análise de correlação foi realizada com os resultados obtidos de inibição dos extratos frente às enzimas colinesterases AChE e BChE. Para isto, foi calculado o desvio padrão relativo (DPR) utilizando a fórmula abaixo, onde DP é o desvio padrão e M é a média das triplicatas. Os resultados de correlação são válidos quando o DPR da inibição das colinesterases é inferior a 20%.

$$DPR (\%) = \frac{DP}{M} \times 100$$

O grau de correlação entre as porcentagens de inibição dos extratos para AChE e BChE foi avaliado pelo cálculo do coeficiente de correlação de Pearson (r), e seu respectivo intervalo de confiança de 95%. O critério de classificação da força de correlação adotado foi: $r < 0,30$ – fraca; $0,30 \leq r \leq 0,70$ – moderada; $r > 0,70$ – forte (Martinez et al., 2014). O nível de significância estatístico adotado para a rejeição da hipótese nula foi $\alpha = 0,05$. Para essa análise foi utilizado o software SPSS, versão 20.0.

2.5 Fracionamento bioguiado do extrato metanólico de *Myrciaria strigipes*

Para essa etapa, foi selecionado o extrato metanólico de folhas de *M. strigipes* que apresentou o maior percentual de inibição para as enzimas AChE e BChE. O fracionamento bioguiado foi feito utilizando-se a técnica de Partição Líquido-Líquido (PLL) e as frações obtidas foram avaliadas pelo ensaio anticolinesterásico.

Para a partição, 1g do extrato foi solubilizado em 100 mL de água ultrapura (*Milli-Q*) com o auxílio de banho ultrassônico (30° C por 15 min). Essa suspensão foi transferida para o funil de separação onde a partição foi feita utilizando-se uma sequência de solventes com polaridade crescente, sendo em ordem: hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. Foram utilizados 100 mL de cada solvente, sendo o processo repetido por três vezes, obtendo-se assim, um volume de aproximadamente de 300 mL para cada fração. Para eliminação dos solventes, as frações foram concentradas em evaporador rotativo. Visando a completa secagem, a fração aquosa remanescente e as demais frações foram posteriormente liofilizadas.

Ao final do fracionamento do extrato metanólico de *M. strigipes* foram obtidas frações em hexano (HFMs), diclorometano (DFMs), acetato de etila (EFMs), *n*-butanol (BFMs) e água (WFMs).

O extrato e frações foram submetidos a prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada, empregando como fase estacionária cromatofolha de sílica gel F₂₅₄. Padrões e reveladores específicos foram usados para análise de cada classe de metabólitos secundários, sendo avaliadas a presença de óleo essencial, triterpeno/esteroide, flavonoide, cumarina, antraquinona, fenólicos, alcaloide e saponina.

2.6 Fingerprint da fração mais ativa de *Myrciaria strigipes*

A impressão digital da fração mais ativa na inibição das colinesterases foi monitorada empregando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD). Os perfis foram determinados em equipamento HPLC Shimadzu, com detector DAD Shimadzu Proeminence, bomba LC - 20 AD, forno CTO - 20 A e software LabSolutions. A coluna utilizada nas eluições foi de fase reversa (C-18) (Shimpack®, 150 mm por 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm e a temperatura do forno foi ajustada em 40°C. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min e o tempo de corrida usado foi de 30 minutos.

As amostras foram preparadas na concentração de 10 mg/mL com metanol grau HPLC (Sigma®), com auxílio de banho ultrassônico a temperatura de 30°C por 10 min. Posteriormente, as amostras foram submetidas a filtração (*milipore* de 45 µm), acondicionadas nos *vials* e levadas para injeção no HPLC. Para a fase móvel, empregou-se sistema binário em gradiente linear, com Fase A: água-ultrapura/ácido

acético 2% (v/v) e Fase B: metanol grau HPLC. O gradiente empregado encontra-se descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Gradiente de eluição empregado na análise da fração EFMs por HPLC-DAD.

Tempo (min)	Concentração de MeOH (%)
0	32
25	48
26	90
28	90
29	32
30	32

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da inibição das enzimas AChE e BChE

Foi avaliado o potencial dos extratos vegetais em inibir as enzimas AChE e BChE por ensaio colorimétrico em microplaca de 96 poços. As porcentagens médias da inibição e desvio padrão dos extratos para ambas enzimas e os respectivos desvios padrões relativos (DPR) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Porcentagem de inibição das enzimas AChE e BChE de 114 extratos de 30 espécies vegetais na concentração final de 400 µg/mL.

Família	Espécie	Voucher	Extrato	% de inibição			
				AChE*	DPR %	BChE*	DPR %
Anacardiaceae	<i>Byrsonima sericea</i> DC.	SAMES-7929	4FDM	38,76(7,14)	18,43	40,50(4,08)	10,06
			4FM	33,97(5,47)	16,12	43,41(1,22)	2,82
			4GDM	35,75(5,44)	15,23	31,08(1,19)	3,82
			4GM	26,27(4,38)	16,67	23,50(4,15)	17,67
Annonaceae	<i>Annona glabra</i> L.	SAMES-7927	2FDM	25,71(1,56)	6,10	22,52(0,25)	1,14
			2FM	26,39(3,05)	11,58	22,13(0,93)	4,23
			2GDM	35,20(4,86)	13,82	39,34(0,02)	0,07
			2GM	32,01(3,22)	10,08	42,41(0,68)	1,61
Apocynaceae	<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	SAMES-7946	7FDM	23,28(1,53)	6,6	11,03(0,89)	8,11
			7FM	20,16(0,98)	4,88	21,33(0,27)	1,28
			7GDM	17,49(1,08)	6,22	21,28(0,62)	2,94
			7GM	14,87(0,74)	4,98	18,53(2,19)	11,85
Tabela 2 - Continua							
	<i>phagedaenicus</i> (Mart.) Woodson	SAMES-7934	10FDM	26,09(0,87)	3,35	19,43(1,36)	7,03
			10FM	20,60(3,70)	17,98	16,50(0,60)	3,64
			10GDM	19,43(2,36)	12,18	25,83(5,27)	20,41
			10GM	11,61(0,89)	7,72	17,82(2,33)	13,07
Aquifoliaceae	<i>Ilex integerrima</i> (Vell.) Reissek	SAMES-7941	18FDM	22,95(4,00)	17,46	13,78(2,31)	16,8
			18FM	24,55(3,48)	14,17	16,96(0,58)	3,47

			18GDM	14,83(2,41)	16,27	33,24(2,37)	7,14
			18GM	15,89(1,21)	7,61	20,91(0,73)	3,49
Asparagaceae	<i>Herreria glaziovii</i> Lecomte	SAMES-7946	23PADM	19,31(0,02)	0,11	17,30(0,78)	4,54
			23PAM	14,22(2,60)	18,33	14,34(0,62)	4,38
Boraginaceae	<i>Cordia taguahyensis</i> Vell.	SAMES-7930	5FDM	32,90(2,34)	7,12	6,91(0,09)	0,001
			5FM	27,71(1,22)	4,4	14,56(1,23)	8,47
			5GDM	30,15(3,51)	11,66	39,43(0,66)	1,67
			5GM	21,16(3,35)	15,84	30,04(1,98)	6,59
	<i>Cordia glabrifolia</i> M. Stapf.	SAMES-7949	26FDM	17,52(1,36)	7,79	9,62(0,04)	0,47
			26FM	14,24(1,11)	7,83	9,02(0,93)	1,03
			26GDM	19,26(0,32)	1,66	21,03(0,65)	3,09
			26GM	13,09(2,01)	15,39	14,98(0,94)	6,3
Burseraceae	<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand. subsp. heptaphyllum	SAMES-7931	6FDM	24,88(1,85)	7,46	12,14(0,17)	1,42
			6FM	32,19(1,15)	3,59	18,77(0,95)	5,07
			6GDM	35,03(3,49)	9,96	41,56(0,93)	2,24
			6GM	22,31(4,60)	20,66	25,88(0,56)	2,17
	<i>Protium icariba</i> (DC.) Marchand	SAMES-7938	15FDM	28,14(1,11)	4,8	20,59(0,02)	0,12
			15FM	12,86(0,18)	1,44	26,41(1,37)	5,19
			15GDM	25,69(3,01)	11,72	40,88(1,22)	2,99
			15GM	24,07(4,51)	18,73	30,54(1,33)	4,38
Celastraceae	<i>Maytenus distichophylla</i> Mart. ex Reissek	SAMES-7936	12FDM	29,76(3,70)	12,44	37,98(0,43)	1,15
			12FM	40,38(3,35)	8,3	51,75(2,03)	3,92
			12GDM	24,62(2,93)	11,91	27,19(0,05)	0,21
			12GM	23,63(1,45)	6,13	22,21(1,43)	6,44
	<i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.	SAMES-7928	3FDM	35,44(1,25)	3,53	30,54(6,40)	20,97
			3FM	27,37(3,90)	14,27	35,40(2,78)	7,85
			3GDM	40,95(2,84)	6,95	51,66(3,58)	6,93
			3GM	39,54(4,27)	10,8	50,69(1,76)	3,49
Commelinaceae	<i>Dichorisandra procera</i> Mart. ex. Schult.f.	SAMES-7954	30PADM	15,72(0,12)	0,81	8,25(0,29)	3,59
			30PAM	5,82(0,53)	9,17	11,53(1,36)	11,82
Chysobalanaceae	<i>Hirtella corymbosa</i> Cham. & Schltld.	SAMES-7944	21FDM	29,07(0,54)	1,86	33,82(1,10)	3,26
			21FM	24,44(1,87)	7,68	31,75(1,69)	5,33
			21GDM	14,42(0,80)	5,54	20,60(1,98)	9,63
			21GM	40,09(2,34)	5,84	56,05(0,85)	1,52
Dilleniaceae	<i>Davilla morii</i> Aymard.	SAMES-7953	29FDM	56,25(1,06)	1,89	54,75(4,17)	7,61
			29FM	47,31(2,17)	4,6	57,50(4,37)	7,59
			29GDM	29,08(2,26)	7,78	36,23(1,31)	3,61
			29GM	34,12(4,19)	12,29	44,22(2,46)	5,57
Fabaceae (Faboideae)	<i>Andira fraxinifolia</i> Benth.	SAMES-7945	22FDM	45,83(3,79)	8,27	43,91(2,36)	5,39
			22FM	58,92(2,81)	4,78	55,40(2,09)	3,79
			22GDM	33,50(5,91)	17,66	36,72(0,32)	0,88
			22GM	28,89(2,59)	8,98	30,57(2,85)	9,32
	<i>Swartzia simplex</i> var. <i>continentalis</i> Urb.	SAMES-7951	27FDM	27,75(2,87)	10,36	12,91(0,39)	3,02
			27FM	13,76(0,68)	4,98	9,75(0,68)	7,06
			27GDM	49,29(1,69)	3,44	50,55(2,85)	5,64
			27GM	39,18(1,54)	3,93	34,86(3,19)	9,16
Lauraceae	<i>Ocotea notata</i> (Nees & Mart.) Mez.	SAMES-7942	19FDM	29,26(2,81)	9,63	24,14(0,70)	2,9
			19FM	23,22(0,11)	0,49	24,79(3,42)	13,82
			19GDM	17,92(2,31)	12,91	29,97(0,75)	2,52
			19GM	20,65(1,97)	9,56	27,72(0,10)	0,39
Malpighiaceae	<i>Stigmaphyllon ciliatum</i> (Lam.) A. Juss	SAMES-7926	1PADM	31,45(2,15)	6,85	21,03(1,05)	5,01
			1PAM	20,47(2,98)	14,59	29,92(0,16)	0,55
Melastomastaceae	<i>Miconia cinnamomifolia</i> (DC.) Naudin	SAMES-7952	28FDM	43,56(2,94)	6,76	46,70(2,98)	6,38
			28FM	46,36(4,69)	10,11	59,89(5,19)	8,67
			28GDM	46,30(1,17)	2,54	42,09(3,09)	7,34
			28GM	48,08(7,04)	14,65	54,47(4,23)	7,76
Moraceae	<i>Sorocea hilarii</i> Gaudich.	SAMES-7947	24FDM	35,12(6,53)	18,59	12,48(0,70)	5,63
			24FM	34,07(1,97)	5,79	9,48(0,67)	7,13
			24GDM	7,72(0,28)	3,69	8,81(0,59)	6,73
			24GM	9,32(0,48)	5,21	10,82(0,79)	7,3
Myrtaceae	<i>Myrciaria strigipes</i> O. Berg.	SAMES-7932	8FDM	53,28(4,65)	8,74	74,74(0,47)	0,64
			8FM	75,91(0,49)	7,88	71,44(1,60)	2,25
			8GDM	31,30(4,52)	14,45	42,33(0,48)	1,13
			8GM	39,58(5,14)	12,99	56,27(1,88)	3,35
		SAMES-7937	13FDM	33,37(2,76)	8,27	41,15(1,16)	2,82
			13FM	40,17(1,60)	3,99	56,08(0,66)	1,18

	<i>Eugenia brejoensis</i> Mazine		13GDM	48,41(4,41)	9,12	44,59(1,07)	2,4
			13GM	44,68(5,32)	11,9	45,52(1,12)	2,46
	<i>Eugenia astringens</i> Cambess	SAMES-7911	14FDM	59,94(2,47)	4,12	61,43(1,41)	2,3
			14FM	31,83(0,96)	3,01	56,13(2,51)	4,47
			14GDM	41,31(2,66)	6,45	53,21(3,04)	5,72
			14GM	41,59(0,18)	0,43	51,41(4,32)	8,41
Piperaceae	<i>Piper arboreum</i> Aubl.	SAMES-7940	17FDM	29,90(4,16)	13,93	56,05(5,44)	9,71
			17FM	23,94(3,86)	16,14	56,81(0,21)	0,37
			17GDM	32,69(1,42)	4,35	39,93(0,49)	1,24
			17GM	13,25(0,29)	2,22	33,34(1,55)	4,66
Polygonaceae	<i>Coccoloba alnifolia</i> Casar.	SAMES-7933	9FDM	25,71(2,53)	9,84	29,20(1,52)	5,23
			9FM	24,82(4,80)	19,36	37,03(1,09)	2,96
			9GDM	23,09(1,80)	7,81	38,30(0,53)	1,4
			9GM	26,54(3,71)	14	34,78(5,54)	15,93
Rubiaceae	<i>Psychotria bahiensis</i> DC.	SAMES-7939	16FDM	32,23(2,13)	6,61	33,33(0,37)	1,11
			16FM	30,61(3,18)	10,39	31,19(0,10)	0,33
			16GDM	32,17(4,07)	12,66	25,79(0,09)	0,37
			16GM	27,08(2,51)	9,27	21,42(1,76)	8,22
Rutaceae	<i>Conchocarpus insignis</i> Pirani	SAMES-7948	25FDM	38,83(0,62)	1,61	11,20(0,61)	5,5
			25FM	54,03(0,16)	0,29	63,43(3,01)	4,75
			25-GDM	12,01(0,94)	7,88	14,02(0,37)	2,65
			25GM	51,15(6,19)	12,1	12,95(0,86)	6,7
Sapindaceae	<i>Cupania emarginata</i> Cambess.	SAMES-7935	11FDM	13,35(2,55)	19,15	16,83(0,98)	5,83
			11FM	18,99(3,67)	19,35	25,68(1,89)	7,38
			11GDM	18,64(1,73)	9,29	24,84(0,38)	1,54
			11GM	16,47(1,79)	10,86	24,98(0,33)	1,33
Sapotaceae	<i>Manilkara subsericea</i> (Mart.) Dubard.	SAMES-7943	20FDM	34,08(1,51)	4,45	54,61(2,41)	4,42
			20FM	45,88(1,08)	2,36	59,88(0,63)	1,06
			20GDM	23,77(0,73)	3,07	30,31(0,24)	0,8
			20GM	16,54(1,66)	10,06	27,08(2,35)	8,68

*Médias das porcentagens (DP).

Os extratos foram categorizados quanto ao potencial inibidor das enzimas AChE e BChE de acordo com Vinutha et al., (2007). Assim, os extratos foram classificados como inibidores potentes (inibição igual ou superior a 50%), inibidores moderados (valores de inibição entre 30 a 50%) e inibidores fracos (com menos de 30% de inibição). Dentre os 114 extratos avaliados, 30 extratos (26,3%) podem ser considerados potentes inibidores, já que inibiram uma ou ambas as colinesterases com valores superiores a 50%. Estes extratos pertencem a 13 diferentes espécies da coleção sendo elas: *Maytenus obtusifolia*, *Myrciaria strigipes*, *Maytenus distichophylla*, *Eugenia brejoensis*, *Eugenia astringens*, *Piper arboreum*, *Manilkara subsericea*, *Hirtella corymbosa*, *Andira fraxinifolia*, *Conchocarpus insignis*, *Swartzia simples var. continentalis*, *Miconia cinnamomifolia* e *Davilla mori* (Tabela 1).

Dentre as famílias botânicas, a família Myrtaceae teve o maior número de extratos ativos. As três espécies da coleção que pertencem a família, *Myrciaria strigipes*, *Eugenia brejoensis* e *Eugenia astringens*, apresentaram extratos com inibição promissora para as colinesterases. Mesmo sendo avaliados extratos provenientes de apenas três espécies de Myrtaceae, os resultados tendem a

demonstrar que esta família se torna relevante para a pesquisa de bioprospecção de compostos inibidores de colinesterase. Este fato pode futuramente estabelecer uma estratégia quimiosistemática para pesquisa de bioprospecção de moléculas anticolinesterásicas, passando a considerar a Myrtaceae uma “família quente”.

Dentre todos os extratos testados, os que apresentaram maior percentual de inibição tanto para AChE como BChE pertencem a espécie *Myrciaria strigipes*. Destaca-se o extrato metanólico das folhas (8FM), que apresentou valores de inibição para AChE e BChE de 75,9 % e de 71,7% respectivamente. De acordo com a classificação de Vinutha et al (2007), o extrato de folhas em diclorometano/metanol (8FDM) e o extrato metanólico de galhos (8GM) de *M. strigipes* podem ser considerados potentes inibidores.

A AChE é predominante no sistema nervoso e em eritrócitos da maioria das espécies, enquanto BChE está presente no plasma sanguíneo de mamíferos, em altas concentrações. Contudo, nos estágios mais avançados da DA ocorre um declínio nos níveis de AChE e um aumento nos de BChE no cérebro (Greig et al., 2005; Agatonovic-Kustrin, Kettle, Morton, 2018). Isto posto, a inibição conjunta de AChE e BuChE pode ser interessante no tratamento de pacientes com DA avançada, embora a maior seletividade para BuChE pode ocasionar efeitos colaterais indesejáveis (Hulme; Birdsall; Buckey, 1990). Por exemplo, o uso de tacrina (mais seletivo para BuChE do que AChE) por pacientes com DA, foi associado a taxas elevadas nos níveis séricos de aminotransferase e danos ao fígado. Devido a esses efeitos colaterais indesejados, a tacrina foi retirada do mercado (Agatonovic-Kustrin, Kettle, Morton, 2018). Apesar da inibição combinada de AChE e BChE ser interessante na terapia para DA, quando se refere a busca por compostos com ação inseticida, a seletividade para AChE é desejada, já que BChE está ausente nos insetos. Assim, inibidores com maior seletividade para AChE podem garantir menor toxicidade para mamíferos. Dessa forma, a avaliação da inibição dos extratos e frações para AChE e BChE é pertinente.

Devido a estes valores de inibição para ambas as colinesterases o extrato 8FM de *M. strigipes* foi selecionado para fracionamento bioguiado.

O gênero *Myrciaria* pertence à família Myrtaceae e possui cerca de 99 espécies conhecidas, das quais 21 são nativas do Brasil (IPNI, 2012). O gênero ocorre em vários biomas brasileiros como a Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa. Espécies pertencentes ao gênero também são encontradas

distribuídas em diversas regiões do Paraguai, Bolívia, Argentina, países da América Central e sul da Florida (Borges, Conceição e Silveira, 2014). Este gênero contém vários componentes ativos pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários, entre os quais destacam-se, principalmente, compostos flavonoidicos e derivados de ácido gálico, bem como monoterpênicos e sesquiterpênicos (Borges, Conceição e Silveira, 2014).

Dentre as atividades biológicas descritas para os extratos de frutos, folhas e cascas de *Myrciaria* estão os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antibacterianos e antifúngicos. Foi relatado que óleos essenciais obtidos das flores e folhas de *Myrciaria floribunda* apresentam atividade inibitória para AChE em ensaio *in vitro* (Tietbohl et al., 2012).

Quanto à espécie *M. strigipes*, existe uma carência de trabalhos sobre sua composição fitoquímica e atividades biológicas. Conhecida popularmente como cambucá-da-praia é uma espécie de ocorrência natural no Brasil, sendo endêmica do sul da Bahia e norte do Espírito Santo (Sobral, 2014). Extratos etanólicos da espécie apresentaram citotoxicidade frente à *Artemia salina*, além de apresentar atividade antioxidante e de inibição das enzimas tirosinase e α -glicosidase (Faitanin et al., 2015; Faitanin et al., 2018). A avaliação do perfil químico de *M. strigipes* indicou a presença de compostos fitoesteroides e triterpênicos (Faitanin et al., 2018).

3.2 Análise de Correlação

No gráfico de dispersão (Figura 1) foi observada uma correlação positiva moderada a forte entre o percentual de inibição da AChE e o percentual de inibição de BChE ($r = 0,70$; IC95%: 0,60 - 0,83; $p < 0,01$). Maiores valores de percentagem de inibição da AChE estão estatisticamente relacionados a maiores valores de percentagem de inibição da BChE. A correlação positiva observada pode estar relacionada com a homologia na sequência de aminoácidos dessas enzimas (> 65%), em especial da tríade catalítica, (serina, glutamato, histidina), essenciais para a atividade enzimática (Giacobini, 2001; Shah et al., 2018).

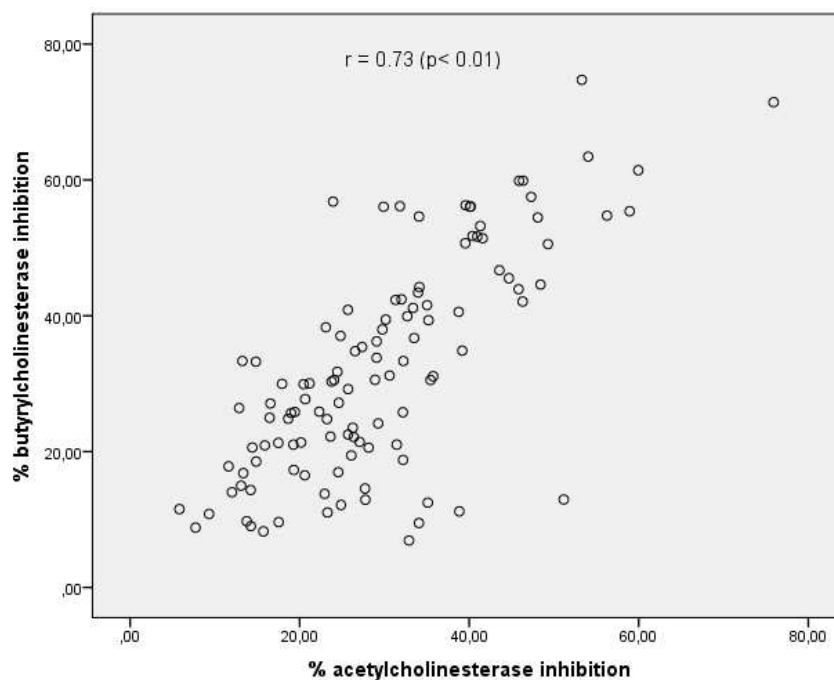


Figura 1 – Gráfico de dispersão do percentual de inibição da AChE e BChE obtida para os 114 extratos avaliados.

3.3 Fracionamento biomonitorado e prospecção fitoquímica

O extrato metanólico de folhas da espécie *M. strigipes* (8FM) foi selecionado para fracionamento por PLL. Esse extrato apresentou, entre todos os testados, o maior percentual de inibição das enzimas AChE e BChE (Tabela 2).

Ao final da PLL, obteve-se quatro frações orgânicas e a fração aquosa, recuperada ao final do processo (Tabela 3). A fração com maior rendimento foi a de *n*-butanol (32,3%), seguido pela fração aquosa (22,3%).

Tabela 3 - Rendimento das frações resultantes do fracionamento do extrato metanólico de folhas de *M. strigipes* (1,0 g), por PLL.

Solventes	Frações*	Rendimento g	Rendimento %
hexano	HFM _s	0,153	15,3
diclorometano	DFM _s	0,087	8,7
acetato de etila	EFM _s	0,141	14,1
<i>n</i> -butanol	BFM _s	0,323	32,3
água	WFM _s	0,223	22,3

* HFM_s: Fração hexânica, DFM_s: fração diclorometânica, EFM_s: Fração em acetato de etila, BFM_s: fração *n*-butanólica, WFM_s: fração aquosa.

A prospecção fitoquímica por CCD possibilitou identificar as classes fitoquímicas presentes no extrato metanólico de folhas de *M. strigipes* e nas cinco frações (Tabela 4). Para a fração EFMs foi detectada a presença de flavonoides e triterpenos/esteroides. Estes compostos já foram descritos em outros extratos de folhas de espécies do gênero, como *Myrciaria floribunda* e *Myrciaria plinioides* (Marmitt et al., 2020; Azevedo et al., 2019).

Tabela 4 – Prospecção fitoquímica do extrato de folhas de *M. strigipes* e das frações obtidas por PLL.

Classes	8FM	HFMs	DFMs	EFMs	BFMs	WFMs
Fenólicos	+	+	+	+	+	+
Fenilpropanóides, Mono e Sesquiterpenos,	+	+	+	-	-	-
Triterpeno e esteroide	+	+	+	+	+	-
Flavonoide	+	+	+	+	+	+
Cumarina	-	-	-	-	-	-
Antraquinona	-	-	-	-	-	-
Alcaloide	-	-	-	-	-	-
Saponina	-	-	-	-	-	-

(+) presença; (-) ausência. 8FM: Extrato metanólico de folhas, HFMs: Fração hexânica de folhas, DFMs: Fração diclorometânica, EFMs: Fração em acetato de etila, BFMs: Fração *n*-butanólica, WFMs: Fração aquosa.

3.4 Avaliação da inibição de AChE pelas frações da PLL

As atividades das frações obtidas na PLL foram avaliadas em ensaio de inibição da AChE e BChE (Tabela 5). Nesse ensaio, as atividades das frações obtidas na partição foram analisadas na concentração de 400 µg/mL. Os resultados revelaram um incremento da atividade inibitória na fração de acetato de etila (EFMs), onde foi obtida uma inibição de 83%. A fração obtida em *n*-butanol (BFMs) e a fração aquosa (WFMs) também apresentaram forte inibição, o que sugere que os compostos responsáveis pela inibição da AChE sejam de natureza polar. Diferentemente, para a enzima BChE a fração mais ativa foi a hexânica (HFMs), com 71,9% de inibição. Esse valor de inibição foi muito semelhante ao obtido para 8FM (71,4%), sugerindo que essa fração concentrou grande parte dos inibidores da BChE e que esses apresentam natureza mais hidrofóbica. Embora apresentando um menor valor de inibição (60,9%) quando comparada a inibição para AChE, EFMs também inibiu a atividade de BChE, indicando que essa fração possui compostos capazes de inibir ambas as enzimas.

Esse resultado é vantajoso para o tratamento da DA, já que a BChE está em maior quantidade no cérebro de paciente no estágio mais avançado da doença.

Tabela 5 – Porcentagem média de inibição da AChE e BChE pelas frações obtidas na PLL na concentração final de 400 µg/mL.

Frações	% de inibição AChE	% de inibição BChE
HFM _s	36,7 ± 4,01	71,9 ± 0,78
DFM _s	51,6 ± 1,52	43,6 ± 1,49
EFM _s	83,1 ± 0,82	60,9 ± 0,15
BFM _s	67,6 ± 3,26	28,5 ± 1,67
WFM _s	68,5 ± 0,82	41,1 ± 3,62
*Fisost.	94,2 ± 0,02	96,3 ± 0,05

HFM_s: Fração hexânica de folhas, DFM_s: Fração diclorometânica, EFM_s: Fração em acetato de etila, BFM_s: Fração *n*-butanólica, WFM_s: Fração aquosa. * Fisostigmina, controle positivo.

Apesar do destaque dado aos inibidores de colinesterases no tratamento de DA, esses compostos também possuem potencial inseticida. Organofosforados e carbamatos são inseticidas sintéticos que atuam na inibição da AChE (Finkelstein et al., 2002; Lang; Zhu; Zhang, 2012). No entanto, o uso intensivo desses compostos resultou no desenvolvimento de resistência em muitos insetos, limitando seu uso. Outra preocupação é a toxicidade desses inseticidas para mamíferos e espécies não alvo (Lang; Zhu; Zhang, 2012). Tal fato revela a importância da busca por novos anticolinesterasicos alvo-específicos para o desenvolvimento de biopesticidas.

3.5 *Fingerprint* do extrato e fração em acetato de etila de *Myrciaria strigipes*

O perfil fitoquímico de EFM_s foi determinado por HPLC-DAD empregando diferentes comprimentos de ondas (λ) para detecção. A maior intensidade dos picos foi observada no λ de 254 nm (Figura 2 A). Os espectros de absorção no UV de alguns picos foram obtidos para maior compreensão da natureza química dos compostos (Figura 2 A e B).

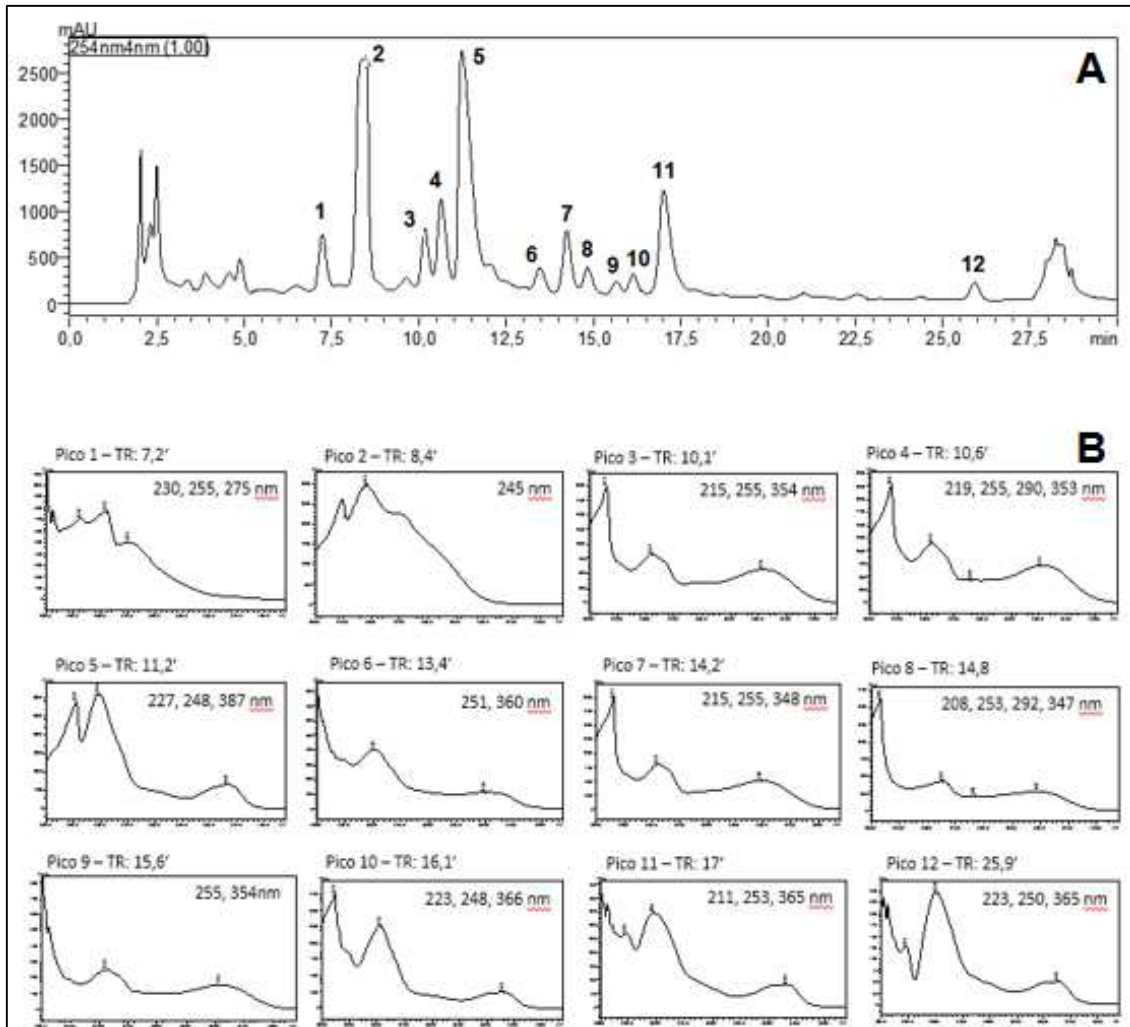


Figura 2 – A) Perfil cromatográfico por HPLC-DAD (254 nm) da fração EFMs obtida na partição líquido-líquido do extrato metanólico de folhas de *M. strigipes*. **B)** Espectros UV-Visível dos picos 1 a 12 do cromatograma.

Pelos espectros no UV, pode-se observar que os picos 3 a 12 apresentam duas bandas de absorção máxima nas regiões entre 245 e 255 nm e de 354 a 387 nm (Figura 2 B). Esse perfil espectral no UV é típico de compostos da classe flavonoides, principalmente de flavonas e flavonóis, que apresentam duas bandas de absorção máxima. Para estes compostos, o espectro na região UV, obtido em solução metanólica, apresenta comumente duas principais bandas de absorção caracterizadas pela banda I (região de 300 a 380 nm), referente a absorção do sistema cinamoíla e pela banda II (região de 240 a 280 nm), envolvendo a absorção do sistema benzoíla (Mabry; Markham e Thomas, 1970). Esse resultado corrobora aquele obtido

na prospecção fitoquímica, que indicou a presença dessa classe de metabólitos em EFMs. Dentre as atividades biológicas relatadas para as flavonas está a inibição das enzimas AChE (Khan et al., 2018) e β -secretase (Shimmyo et al., 2008), ambas envolvidas na DA.

Azevedo et al. (2019) descreve a composição química do extrato metanólico de folhas de *Myrciaria floribunda*, indicando a presença dos flavonoides catequina, quercitrina e miricetina. Também foi detectada a presença dos flavonoides rutina, quercetina e luteonina em extratos de *Myrciaria plinioides*. Esses extratos mostraram potente inibição da enzima AChE (Mamitt et al., 2019). Inibição das colinesterases AChE e BChE já foi relatada para os flavonoides de aglicona quercetina, luteonina e miricetina (Yener et al., 2020). Dessa forma, a atividade anticolinesterásica observada em EFMs pode estar relacionada a presença de flavonoides nessa fração

4 CONCLUSÕES

O potencial anticolinesterásico de 114 extratos de 30 espécies vegetais foi avaliado, com destaque para o extrato de folhas de *M. strigipes*. Esse extrato apresentou o maior percentual de inibição tanto para AChE como para BChE. Ao se avaliar uma fração enriquecida de flavonoides dessa planta observou-se um incremento da atividade inibitória contra AChE, obtendo-se percentual de inibição de 83%. Este é o primeiro relato de atividade anticolinesterásica para *M. strigipes*. Nossos resultados sugerem que a atividade da planta está relacionada a compostos flavonoides. Contudo, são necessários novos estudos para identificação desses inibidores e avaliação de seu mecanismo de ação.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Outorga: GD 142313 / 2015-7) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; Outorga: CDS - APQ-02540-15) pelo apoio financeiro. Ao Laboratório de Educação Ambiental (LabEA) e ao herbário-SAMES da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES, campus São Mateus) pela logística nas expedições à campo, identificação botânica e depósito das exsiccatas. Ao Instituto Estadual de Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos (IEMA) do Espírito Santo pela autorização das

coletas do material vegetal e ao parque estadual de Itaúnas pelo apoio nas expedições.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses potencial.

REFERENCIAS

AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; KETTLE, C.; MORTON, D. W. A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease. *Biomedicine & pharmacotherapy*, v. 106, p. 553-565, 2018.

ALMEIDA, A.A.; LIMA, G.D.A.; SIMÃO, M.V.R.C.; MOREIRA, G.A.; SIQUEIRA, R.P.; ZANATTA, A.C.; VILEGAS, W.; MACHADO-NEVES, M.; BRESSAN, G.C.; LEITE, J.P.V. Screening of plants from the Brazilian Atlantic Forest let to identification of *Athenaea velutina* (Solanacea) as a novel source of antimetastatic agents. *Int J Exp Path.* 101(3-4):106–121, 2020.

ASHA, H. A. Review: Natural Compounds as Anti-Alzheimer's Disease Agents. *Curr. Nutr. Food Sci.*, v.13, p. 247–254, 2017.

AZEVEDO, M.M.L.; CASCAES, M.M.; GUILHON, G.M.S.P.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.D.G.B.; SILVA, J.K.R.; SANTOS, L.S.; SILVA, S.H.M. Lupane triterpenoids, antioxidant potential and antimicrobial activity of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg. *Nat Prod Res.*,33(4):506-515, 2019.

BALLATORE, C., LEE, V. M. AND TROJANOWSKI, J. Q. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 8, 663-672, 2007.

BOONYAKETGOSON, S.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S.; TRISUWAN, K. Naphthoquinones from the leaves of *Rhinacanthus nasutus* having acetylcholinesterase inhibitory and cytotoxic activities. *Fitoterapia* 124, 206-210, 2018.

BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. *Food Chemistry*. v. 153, p. 224-233, 2014.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat Prod Rep.*, 31(11):1612-61, 2014.

CHAVES, M. B.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Terapia Medicamentosa da Doença de Alzheimer. *Revista eletrônica de Farmácia*, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2008. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/articte/view/4608/3931>. Acesso em: 13 jun. 2019.

CUMMINGS, J.L.; TONG, G.; BALLARD, C. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *J. Alzheimers Dis.*, 67(3):779-794, 2019.

DE FALCO, A.; CUKIERMAN, D.S.; HAUSER-DAVIS, R.A.; REY, N.A. Alzheimer's disease: etiological hypotheses and treatment perspectives. *Química Nova*, [S.l.]. GN1 Genesis Network., v. 39, n. 1, p.63-80, 2016.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. Jr. Feather-stone RM) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7:88–95, 1961.

FAITANIN, R. D.; GOMES, J. V. D.; RODRIGUES, P. M.; MENEZES, L. F. T.; NETO, A. C.; GONÇALVES, R. C. R.; KITAGAWA, R. R.; SILVEIRA, D.; JAMAL, C. M. Chemical study and evaluation of antioxidant activity and α glucosidase inhibition of *Myrciaria strigipes* O. Berg. (Myrtaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. v. 8(3), p. 120-125, 2018.

FAITANIN, R. D.; GOMES, J.V.D.; MENEZES, L.F.T.; BRASILEIRO, B. G.; JAMAL, C. M. Phytochemical screening, cytotoxic and thrombolytic activity evaluation of *Myrciaria strigipes* O. Berg., *Ipomoea alba* L. and *Solanum cordifolium* Dunal leaves. *Pharmacologyonline* (Salerno), v. 3, p. 131-135, 2015.

FINKELSTEIN, B, L.; BENNER, E. A.; HENDRIXSON, M. C.; KRANIS, K. T.; RAUH, J. J.; SETHURAMAN, M. R.; MCCANN, S. F. Tricyclic Cyanoguanidine: Synthesis, Site of Action and Insecticidal Activity of a Novel Class of Reversible Acetylcholinesterase Inhibitors. *Bioorganic & medicinal Chemistry*, v. 10, n. 599, p. 613, 2002.

GIACOBINI, E. Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *Drugs Aging*., 18, 891–898, 2001.

GREIG, N. H.; UTSUKI, T.; IGRAN, D. K.; WANG, Y.; PEPEU, G.; SCALI, C.; YU, Q-S.; MAMCZARZ, J.; HOLLOWAY, H. W.; GIORDANO, T.; CHEN, D.; FURUKAWA, K.; SAMBAMURTI, K.; BROSSI, A.; LAHIRI, D. K. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 17213, 2005.

HUANG, L., SU, T. AND LI, X. Natural products as sources of new lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 13, p.1864-1878, 2013.

HULME, E. C.; BIRDSALL, N. J.; BUCKLEY, N. J. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 30:633-73, 1990.

INPI. The international plant name index (<http://ipni.org/>) The Royal Botanic Gardens, Kew: The Harvard University Herbaria; Australian National Herbarium. 2012.

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.

JUNG, H. A., JIN, S. E., PARK, J. S.; CHOI, J. S. Antidiabetic complications and anti-Alzheimer activities of sophoflavescenol, a prenylated flavonol from *Sophora flavescens*, and its structure-activity relationship. *Phytotherapy Research* 25, p. 709-715, 2011.

KHAN, H.; MARYA; AMIN, S.; KAMAL, M.A.; PATEL, S. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. *Biomed. Pharmacother.*, 101, 860–870, 2018.

KIM, J.; LEE, H.J.; LEE, K.W. Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 112, p. 1415–1430, 2010.

LANG, G.; ZHU, K.; & ZHANG, C. A. acetilcolinesterase pode servir como alvo para o desenvolvimento de inseticidas mais seletivos? *Alvos de drogas atuais*, 13 (4), p. 495-501, 2012.

LEBLHUBER, F.; STEINER, K.; SCHUETZ, B.; FUCHS, D.; GOSTNER, J. M. Probiotic Supplementation in Patients with Alzheimer's Dementia - An Explorative Intervention Study. *Curr Alzheimer Res.*,15(12):1106-1113, 2018.

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.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1970.

MARMITT, D.J.; ALVES, C.; SILVA, J.; PINTEUS, S.; SCHNEIDER, T.; SANTOS, R.C.V.; FREITAS, E. M.; PEDROSA, R.; LAUFER, S.; GOETTERT, M.I. Potencial neuroprotetor do extrato de *Myrciaria plinioides* D. Legrand em um modelo de neuroblastoma humano in vitro. *Inflammopharmacology*. 28, 737-748, 2020.

MARTÍNEZ GONZÁLEZ, M. A.; SÁNCHEZ-VILLEGAS, A.; TOLEDO ATUCHA, E. A.; FAULIN, J. *Bioestadística amigable*. 3 ed. Barcelona: Elsevier, 2014.

MCCLOUD, T. G. High Throughput Extraction of Plant, Marine and Fungal Specimens for Preservation of Biologically Active Molecules. *Molecules*, v.15, p. 4526-4563; doi:10.3390/molecules15074526, 2010.

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.

ORHAN, G.; ORHAN, I.; SUBUTAY-OZTEKIN, N. A. K., F.; SENER, B. Contemporary anticholinesterase pharmaceuticals of natural origin and their synthetic analogues for the treatment of Alzheimer's disease. *Recent Patents in CNS Drug Discovery*, 4, p. 43-51, 2009.

POHANKA, M. Review: Inhibitors of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Meet Immunity. *Int. J. Mol. Sci.*, 15, p. 9809-9825, 2014.

RUSSO, P.; FRUSTACI, A.; DEL BUFALO, A.; FINI, M.; CESARIO, A. Multitarget drugs of plants origin acting on Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* 20, p.1686–1693, 2013.

SACCARO JUNIOR, Nilo L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Brasília, 2011.

SHIMMYO, Y.; KIHARA, T.; AKAIKE, A.; NIIDOME, T.; SUGIMOTO, H. Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure-activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features. *Biochim. Biophys. Acta*, 1780, 819–825, 2008

SOBRAL, M. *Myrciaria* in Flora do Brasil 2020 em construção: Jardim Botânico do Rio de Janeiro 2014. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/10801> Acesso em: 10 jun. 2019.

TIETBOHL, L.A.C., LIMA, B.G., FERNANDES, C.P., SANTOS, M.G., SILVA, F.E.B., DENARDIN, E. L. G., et al. Comparative study and anticholinesterasic evaluation of essential oils from leaves, stems and flowers of *Myrciaria floribunda* (H.West ex Willd.) O. Berg. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 31(4), p. 637–641, 2012.

VINUTHA, B.; PRASHANTH, D.; SALMA, K.; SREEJA, S. L.; PRATITI, D.; PADMAJA, R.; RADHIKA, K.; AMIT, A.; VENKATEKHWARLU, K.; DEEPAK, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, p. 359-36, 2007.

YENER, I.; KOCAKAYA, S.O.; ERTAS, A.; ERHAN, B.; KAPLANER, E.; ORAL, E.V.; YILMAZ-OZDEN, T.; YILMAZ, M. A.; OZTURK, M. KOLAK, U. Selective in vitro and in silico enzymas inhibitors activity of phenolic acids and flavonoids of food plants: Relations with oxidative stress. *Food Chemistry*, 327, 127045, 2020.

ZHANG, P.; XU, S.; ZHU, Z.; XU, J. Multi-target design strategies for the improved treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.*, 15;176:228-247, 2019.

Capítulo 2 – Artigo II

TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA IN VITRO DE PLANTAS DA MATA ATLÂNTICA INDICA *Eugenia astringens* Cambess (MYRTACEAE) COMO FONTE DE COMPOSTOS SESQUITERPENICOS ANTIBACTERIANOS

Ana Paula Agrizzi^a, Laís Azevedo Rodrigues^a, Iorrana Vieira Salustiano^a, Cristiane Aparecida Franco^b, Eduardo Vinícius Vieira Varejão^b, Andréa de Oliveira Barros Ribon^a, João Paulo Viana Leite^a

^aDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Brazil.

^bDepartamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Brazil.

*Corresponding author: agrizzianapaula@gmail.com, jpvleite@ufv.br

Resumo

Antecedentes: A busca por agentes antibacterianos de origem natural é uma importante estratégia de enfrentamento a infecções causadas por bactérias multirresistentes. Neste contexto, o presente estudo avaliou a atividade antibacteriana de 114 extratos oriundos de espécies vegetais da Mata Atlântica frente a bactérias causadoras de infecções humanas e veterinárias. **Métodos:** Em uma triagem inicial, a atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada *in vitro* pelo método de microdiluição, contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O extrato mais promissor foi selecionado para fracionamento bioguiado pela técnica de partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades. A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato e das frações da partição foram avaliadas contra outras cinco bactérias do gênero *Staphylococcus* e duas bactérias Gram-negativas. A associação entre o extrato e a fração bioativa com antibióticos de diferentes classes foi investigada sobre a bactéria *S. aureus* resistente a metilina (MRSA) estirpe USA 300. A técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) foi empregada na identificação dos constituintes da fração mais ativa. **Resultados:** O extrato em diclorometano-metanol 1:1 (v/v) de folhas de *Eugenia astringens* Cambess (EBEa) inibiu o crescimento de *S. aureus* com CIM de 23 µg/mL. No fracionamento bioguiado desse extrato, a fração hexânica (HFEa) destacou-se pela inibição de seis bactérias do gênero *Staphylococcus*, incluindo a MRSA USA 300, com CIM de 2,9 µg/mL. Foi observada interação sinérgica entre o antibiótico ofloxacina e EBEa, assim como com HFEa, com diminuição de 4x no valor de CIM quando associado com 1/8 da CIM do extrato ou fração. Análise em CG-EM mostrou a presença majoritária de compostos sesquiterpênicos em HFEa, indicando que a atividade antibacteriana de *E. astringens* pode estar associada a esses compostos. **Conclusão:** *E. astringens* é fonte de compostos ativos contra *Staphylococcus* spp e tem potencial para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas com ação antibacteriana isolada ou em associação com outros antibióticos.

Palavras chave: Atividade antibacteriana, *Eugenia astringens*, produtos naturais, Mata Atlântica, *Staphylococcus* spp.

1 INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de antibióticos para tratamento de doenças humanas e veterinárias tem promovido o surgimento de bactérias multirresistentes em todo o mundo (Barton, 2000; Sengelov et al., 2003; Van Boeckel et al., 2015). Estima-se que se não houver um esforço global para alterar esse cenário, até 2050 mais de 10 milhões de mortes anuais serão causadas por microrganismos resistentes a antibióticos (O'Neill, 2014; Kraker, Stewardson e Harbarth, 2016). Embora alguns autores contestem essa informação, são inquestionáveis os prejuízos associados a resistência a antibióticos para a saúde pública mundial (Kraker, Stewardson e Harbarth, 2016; Robinson et al., 2016).

No século passado, o aumento da resistência antibacteriana potencializou os investimentos em pesquisas que levaram a descoberta de novos agentes antimicrobianos. Entretanto, nas últimas décadas houve um agravamento da resistência bacteriana com a diminuição considerável no desenvolvimento de novos antibióticos, tornando urgente a retomada da inserção de novas drogas no mercado (Livermore, 2011; Cheesman et al., 2017; Lakemeyer et al., 2018).

Dentre as estratégias para deter a disseminação das bactérias multirresistentes está a busca por novos agentes antibacterianos (WHO, 2015; Blair et al., 2015). Nesse contexto, os compostos naturais destacam-se como fontes de novas moléculas bioativas. Entre 1981 e 2019, dos 162 agentes antibacterianos aprovados para tratamento de infecções, cerca de 48%, foram derivados de produtos naturais (Newman e Cragg, 2020). Além disso, estruturas químicas básicas de origem natural, como das tetraciclínas, aminoglicosídeos e cefalosporinas, descobertas a aproximadamente 75 anos, ainda hoje são a base para o desenvolvimento de novos antibióticos (Newman e Cragg, 2020). Outra estratégia na busca por novos antibacterianos se baseia na interação sinérgica entre extratos de plantas e antibióticos usados na clínica médica que potencializa a ação antibiótica (Inui et al., 2007; Cheesman et al., 2017).

O bioma Mata Atlântica, com sua rica biodiversidade vegetal, aliada a bioprospecção de produtos naturais, é uma importante fonte de novos compostos ativos capazes de combater infecções bacterianas. O bioma abriga de 1 a 8% de toda a biodiversidade do planeta, dispondo de aproximadamente 20 mil espécies vegetais (Myers et al., 2000; SOSMA, 2005). Entre estas o gênero *Eugenia* destaca-se pelo

potencial econômico e farmacológico (Queiroz et al., 2015). No Brasil, existem cerca de 400 espécies de *Eugenia* distribuídas em todo o território, que possuem diferentes atividades biológicas como anti-inflamatória, antibacteriana, citotóxica, antioxidante, antiviral, tripanocida e hipoglicemiante (Lago et al., 2011; Queiroz et al., 2015).

Eugenia astringens Cambess, conhecida popularmente como guamirim, ocorre em Sergipe, Bahia, sudeste e sul do Brasil (Sobral et al., 2012). Tem como espécies sinônimas *E. apiocarpa*, *E. umbeliflora*, *E. cyclophylla*, *E. rotundifolia* e *E. cassinoides* (SIBBr, 2021). Defaveri et al. (2011) descreveram a composição dos óleos essenciais de *Eugenia astringens*, com predominância de compostos monoterpênicos com baixa atividade antioxidante. Atividade antibacteriana foi mostrada para *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Magina et al., 2009).

Staphylococcus aureus é um importante patógeno humano e veterinário conhecido por seu arsenal de fatores de virulência e extraordinária capacidade de adquirir resistência a diferentes antibióticos, o que restringe as opções de tratamento (Soni; Chakrapani; Chopra, 2015; Tong et al. , 2015). O clone USA300 é resistente à meticilina (MRSA) e a fluoroquinolonas, o que deve ter contribuído para sua disseminação mundial (Hageman et al., 2006).

Considerando a demanda por novos antibióticos, o objetivo deste trabalho foi prospectar espécies vegetais como fonte de produtos naturais antibacterianos frente a bactérias causadoras de infecções em humanos e animais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e preparação de extratos

O acesso ao material vegetal ocorreu nas áreas de restinga, ecossistema que integra o bioma Mata Atlântica, da unidade de conservação Parque Estadual de Itaúnas (PEI). O PEI está localizado no município de Conceição da Barra, litoral norte do estado do Espírito Santo (Latitude: 18° 25'5.97" S - Longitude 39° 42'25.68" O). A coleta foi autorizada pelo Instituto Estadual de Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos (IEMA), órgão responsável pela gestão das unidades estaduais de conservação. O acesso ao patrimônio genético foi também cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) (Cadastro nº A381FA0).

Utilizando abordagem randômica, foram coletados folhas e galhos de espécies vegetais férteis de porte arbóreo e arbustivo, e parte aérea de plantas herbáceas. A coordenada geográfica de cada espécie foi registrada com auxílio do aplicativo de georreferenciamento *Get Geo-Coordinates*. Uma exsicata de cada espécie foi produzida e depositada no herbário SAMES da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – *Campus* São Mateus. A identificação botânica das espécies foi realizada pelos especialistas do herbário com auxílio de bibliografias especializadas e consulta ao acervo.

Para a produção dos extratos, o material vegetal foi desidratado em estufa de ventilação forçada a temperatura constante de 40°C por 48 h. O material seco obtido foi pulverizado em moinho de facas, pesado e posteriormente depositado em percolador de aço inox juntamente com os solventes extratores na proporção 1:5 (m/v). Na primeira etapa de extração, foram adicionados ao percolador diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) na proporção de 1:1 (v/v), permanecendo em maceração por aproximadamente 15 h. Após esse tempo, o extrato foi drenado e a torta remanescente submetida a nova extração com MeOH por mais 15 h, sendo também drenado posteriormente. Para ambos os extratos, os solventes foram eliminados empregando evaporador rotativo e liofilizador. Todos extratos secos obtidos foram armazenados em freezer a - 20°C, passando a compor a coleção *BIOPROS Extracts Library*.

Os extratos foram codificados, recebendo as seguintes abreviações: FDM (folhas extraídas com DCM:MeOH 1:1), FM (folhas extraídas com MeOH), GDM (galho extraído com DCM:MeOH 1:1) e GM (galho extraído com MeOH), PADM (parte aérea extraída com DCM:MeOH) e PAM (parte aérea extraída com MeOH).

2.2 Fracionamento do extrato de *Eugenia astringens*

O extrato em DCM:MeOH de folhas de *E. astringens* (EBEa), apresentando o menor valor da CIM sobre *S. aureus*, foi selecionado para fracionamento bioguiado utilizando-se a técnica de partição líquido-líquido (PLL).

Para a partição, 1g do extrato foi solubilizado em 100 mL de água ultrapura (*Milli-Q*) com o auxílio de banho ultrassônico (30°C por 15 min). Essa suspensão foi transferida para o funil de separação e submetida a partição utilizando-se uma sequência de solventes com polaridade crescente, sendo em ordem: hexano,

diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. Ao final, a fração aquosa foi liofilizada. Foram utilizados 100 mL de cada solvente, sendo o processo repetido por três vezes, obtendo-se assim, um volume de 300 mL para cada fração. As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo e em seguida liofilizadas para completa secagem.

Ao final foram obtidas as seguintes frações de EBEa, com seus respectivos rendimentos: hexânica (HFEa: 35,4%), diclorometânica (DFEa: 16,1%), em acetato de etila (EFEa: 14,9%), butanólica (BFEa: 24,8%), e aquosa (WFEa: 8,8%).

Ensaio de determinação da CIM para diferentes estirpes bacterianas foram empregados para monitorar os compostos bioativos nas frações.

2.3 Prospecção fitoquímica do extrato bioativo e frações

Prospecção fitoquímica de EBEa e suas frações foi realizada por cromatografia em camada delgada, empregando como fase estacionária cromatofolhas de sílica gel F₂₅₀ (Merck®). Foram utilizados reveladores e padrões específicos para as diferentes classes de metabólitos secundários (Wagner, 1996; Harbone, 1984).

As classes avaliadas, foram: fenólicos, óleos essenciais, triterpenos/esteroides, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, alcaloides e saponinas. Duas fases móveis foram selecionadas, sendo a fase móvel 1 a mistura de tolueno, éter etílico e ácido acético (49:49:2); e a fase móvel 2, constituído por tolueno, metanol e ácido acético (60:38:2).

2.4 Microrganismos e condições de cultura

Para a triagem de atividade antibacteriana dos extratos, foram selecionadas a estirpe gram-positiva *S. aureus* ATCC 29213 e a gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 25922. Na avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram selecionadas as cepas de bactérias gram-positivas: *S. epidermidis* ATCC 359883, *S. intermedius* ATCC 29663, *S. hyicus* ATCC 11249, *S. Chromogenes* ATCC 5607 e *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) cepa USA 300. Entre as gram-negativas, foram incluídas: *Salmonella enteritidis* ATCC 13706 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853.

A semeadura das células bacterianas foi realizada pela técnica de esgotamento

por estrias em placas contendo meio ágar Müller Hinton (MH - Sigma-Aldrich®), de 15 a 24h anteriores a cada ensaio. Posteriormente, as placas foram mantidas em estufa a temperatura de 37°C. O estoque das culturas foi conservado a - 80°C em meio BHI (Brain Heart Infusion - Merck®) contendo 20% de glicerol.

2.5 Triagem antibacteriana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a avaliação da atividade antibacteriana, estoques de todos os extratos foram preparados na concentração de 30 mg/mL⁻¹ em dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec®).

A triagem inicial foi realizada em placas de 96 poços (polietileno, Kasvi®) pelo método de microdiluição. Em cada poço foi adicionado caldo MH, suspensão de *S. aureus* ou *E. coli* ajustada para 0,5 (10⁸ UFC/mL) na escala *McFarland* e alíquotas de cada extrato vegetal nas concentrações 3000 µg/mL, 1500 µg/mL, 750 µg/mL e 375 µg/mL. Os controles foram preparados de duas formas: um contendo apenas caldo MH, e outro com caldo MH e adição de DMSO na mesma concentração das amostras de extrato. Posteriormente, as microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após esse período, o crescimento bacteriano foi avaliado com cloreto de *p*-iodonitrotetrazolio (INT, I8377, Sigma®) na concentração 2 mg/mL, deixando reagir por 2h a 37°C. A mudança da coloração do amarelo para o róseo-violeta foi usada como indicativo de inviabilidade celular. Este ensaio foi realizado utilizando-se três réplicas biológicas.

Os extratos que apresentaram 100% de inibição na concentração de 375 µg/mL, foram selecionados para determinação da CIM sobre *S. aureus* com concentrações com variação entre 375 µg/mL a 11,7 µg/mL. Finalmente, o extrato mais ativo nesse ensaio foi selecionado para fracionamento bioquímico.

A CIM do extrato selecionado e de suas respectivas frações, foi avaliada sobre *S. aureus* (testada anteriormente), *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. chromogenes* e MRSA USA 300, *P. auresginosa* e *S. enteritidis*. As concentrações avaliadas nesse ensaio variaram de 1500 µg/mL a 0,36 µg/mL.

2.6 Análise de Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massas

A fração de EBEa com menor valor de CIM foi submetida a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). A análise foi realizada em um aparelho Shimadzu CGMS – QP5050A (Shimadzu Europe, Duisburg, Germany) nas seguintes condições operacionais: método por impacto de elétrons (70 eV); coluna capilar Ultra Alloy 5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); fluxo de gás transportador (He) 1mL/min, temperatura do injetor 290°C, operando com temperatura inicial de 45°C por 2 min., gradiente de 20°C min até 300°C. Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus espectros de massas com os dados da biblioteca do equipamento. Apenas os compostos cujos espectros de massa apresentaram porcentagem de similaridade igual ou maior que 90%, em relação aos espectros do banco de dados do equipamento, foram reportados como identificados.

2.7 Ensaio de sinergismo

A combinação de EBEa ou da fração mais ativa com antibióticos, foi avaliada pelo método checkboard (Palaiappan e Holley, 2010). Para essa análise, foram utilizados os antibióticos ofloxacina (quinolona), gentamicina (aminoglicosídeo), penicilina e ampicilina (penicilinas), cefaclor e ceftriaxona (cefalosporinas). A CIM desses antibióticos sobre USA 300 foi determinada como descrito anteriormente.

O ensaio foi realizado em seis diluições em duas séries (horizontal e verticalmente) de forma a obter diferentes combinações de extrato ou fração e cada um dos antibióticos avaliados. Essas combinações apresentaram valores de 2x a 1/8 da CIM de cada componente. Depois disso, 100 µL de suspensão bacteriana correspondente a 0,5 de turbidez da escala de *McFarland* foi adicionado a cada poço da microplaca. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C e após esse período, INT foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada por mais 2 h. O resultado foi determinado pela alteração da coloração, do amarelo para o róseo violeta onde houve crescimento bacteriano.

O efeito das combinações foi calculado pelo índice FIC (Combinação Inibitória Fracionária) usando as fórmulas abaixo.

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

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

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

As combinações foram consideradas sinérgicas quando o valor do índice FIC foi $\leq 0,5$; aditivas, quando o valor do índice foi $> 0,5$ e ≤ 1 e indiferente quando o valor foi >1 e ≤ 4 . Valores superiores a 4 são definidas como interação antagônica (Zhao et al., 2002; Odds, 2003 ; Hemaiswary, Kruthiventi; Doble, 2008; Palaniappan e Holley, 2010; Caesar e Cech, 2019).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Triagem da atividade antibacteriana dos extratos

Todos os 114 extratos produzidos a partir de folhas, galhos, ou parte aérea de 30 espécies foram avaliados quanto ao potencial de inibir o crescimento da bactéria Gram-positiva *S. aureus* ATCC 29213 e da Gram-negativa *E. coli* ATCC 25922 (Tabela 1), dois importantes patógenos humano e veterinário.

Tabela 1 – Triagem da atividade antibacteriana dos extratos vegetais frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Nº	FAMÍLIA	ESPÉCIE	VOUCHER	Concentração inibitória dos extratos (µg/mL)					
				FDM	FM	GDM	GM	PADM	PAM
1	Anacardiaceae	<i>Byrsonima sericea</i> DC.	SAMES-7929	375	375	375	375	-	-
2	Annonaceae	<i>Annona glabra</i> L.	SAMES-7927	NI	NI	375	1500	-	-
3	Apocynaceae	<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	SAMES-7946	NI	375	1500	375	-	-
4	Apocynaceae	<i>Himatanthus phagedaenicus</i> (Mart.) Woodson	SAMES-7934	NI	NI	NI	NI	-	-
5	Aquifoliaceae	<i>Ilex integerrima</i> (Vell.) Reissek	SAMES7941-	NI	375	NI	NI	-	-
6	Asparagaceae	<i>Herreria glaziovii</i> Lecomte	SAMES-7946	-	-	-	-	NI	NI
7	Boraginaceae	<i>Cordia taguahyensis</i> Vell.	SAMES-7930	NI	NI	1500	NI	-	-
8	Boraginaceae	<i>Cordia glabrifolia</i> M. Stapf.	SAMES-7949	NI	NI	NI	NI	-	-
9	Burseraceae	<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.)	SAMES-7931	1500	750	750	375	-	-
10	Burseraceae	<i>Protium icariba</i> (DC.) Marchand	SAMES-7938	1500	375	375	375	-	-
11	Celastraceae	<i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.	SAMES-7928	375	375	375	375	-	-
12	Celastraceae	<i>Maytenus distichophylla</i> Mart. ex Reissek	SAMES-7936	750	750	375	375	-	-
13	Chrysobalanaceae	<i>Hirtella corymbosa</i> Cham. & Schtdl.	SAMES-7944	750	375	NI	375	-	-
14	Commelinaceae	<i>Dichorisandra procera</i> Mart. ex. Schult.f.	SAMES-7954	-	-	-	-	NI	NI
15	Dilleniaceae	<i>Davilla morii</i> Aymard.	SAMES-7953	375	375	750	375	-	-
16	Fabaceae	<i>Swartzia simplex</i> var. <i>continentalis</i> Urb.	SAMES-7951	NI	NI	375	375	-	-
17	Fabaceae	<i>Andira fraxinifolia</i> Benth	SAMES-7945	375	375	375	375	-	-
18	Lauraceae	<i>Ocotea notata</i> (Nees & Mart.) Mez.	SAMES-7942	375	375	375	375	-	-
19	Malpighiaceae	<i>Stigmaphyllon ciliatum</i> (Lam.) A. Juss	SAMES-7926	-	-	-	-	NI	750
20	Melastomataceae	<i>Miconia cinnamomifolia</i> (DC.) Naudin	SAMES-7952	1500	375	NI	750	-	-
21	Moraceae	<i>Sorocea hilarii</i> Gaudich.	SAMES-7947	NI	NI	NI	NI	-	-
22	Myrtaceae	<i>Myrciaria strigipes</i> O. Berg.	SAMES-7932	1500	1500	1500	375	-	-
23	Myrtaceae	<i>Eugenia brejoensis</i> Mazine	SAMES-7937	375	375	1500	750	-	-
24	Myrtaceae	<i>Eugenia astringens</i> Cambess	SAMES-7911	375	375	375	375	-	-
25	Piperaceae	<i>Piper arboreum</i> Aubl.	SAMES-7940	NI	75	NI	NI	-	-
26	Polygonaceae	<i>Coccoloba alnifolia</i> Casar.	SAMES-7933	NI	375	1500	375	-	-
27	Rubiaceae	<i>Psychotria bahiensis</i> DC.	SAMES-7939	1500	NI	NI	NI	-	-
28	Rutaceae	<i>Conchocarpus insignis</i> Pirani	SAMES-7948	1500	1500	NI	NI	-	-
29	Sapindaceae	<i>Cupania emarginata</i> Cambess.	SAMES-7935	750	375	375	375	-	-
30	Sapotaceae	<i>Manilkara subsericea</i> (Mart.) Dubard	SAMES-7943	750	375	375	375	-	-

FDM: extrato de folha em DCM:MeOH; FM: extrato metanólico de folhas; GDM: extrato de galho DCM:MeOH; GM: extrato metanólico de galho, PADM: extrato de parte aérea com DCM:MeOH; PAM: extrato metanólico da parte aérea; NI: não houve inibição do crescimento bacteriano; (-) não testado.

Um total de 47 extratos de 19 espécies foram considerados promissores por apresentarem CIM de 375 µg/mL. Esses extratos foram selecionados para nova

determinação de CIM entre os valores de 375 µg/mL a 11,7 µg/mL (Tabela 2). Nenhum dos extratos inibiu o crescimento de *E. coli* nas concentrações testadas, provavelmente devido à natureza complexa de sua membrana celular externa. A permeabilidade limitada dessa membrana torna essas bactérias mais resistentes a ação de antibióticos, que em geral são incapazes de atravessar essa barreira (Guimarães; Momesso; Pupo, 2010). Aligiannis et al. (2001) definem como forte inibição um valor da CIM de até 500 µg/mL; uma inibição moderada valores entre 600 e 1500 µg/mL e uma fraca inibição uma CIM acima de 1600 µg/mL. Outros autores, no entanto, relatam que os extratos brutos de produtos naturais com CIM abaixo de 1000 µg/mL são considerados relevantes e os extratos com CIM abaixo de 100 µg/mL são considerados potenciais agentes antibacterianos (Gibbons, 2004; Van Vuuren, 2008).

Tabela 2 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos vegetais frente a *S. aureus* ATCC 29213.

FAMÍLIA	ESPÉCIE	VOUCHER	EXTRATO	CIM (µg/mL)		
Anacardiaceae	<i>Byrsonima sericea</i> DC.	SAMES-7929	FDM	187		
			FM	187		
			GDM	187		
			GM	187		
Annonaceae	<i>Annona glabra</i> L.	SAMES-7927	GDM	375		
Apocynaceae	<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	SAMES-7946	FM	375		
			GM	375		
Aquifoliaceae	<i>Ilex integerrima</i> (Vell.) Reissek	SAMES-7941	FM	375		
Burseaceae	<i>Protium heptaphyllum</i> . (Aubl.)	SAMES-7931	GM	375		
			<i>Protium icariba</i> (DC.) Marchand	SAMES-7938	FM	375
					GDM	375
			GM	375		
Celastraceae	<i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.	SAMES-7928	FDM	375		
			FM	375		
			DM	375		
			GM	375		
Chrysobalanaceae	<i>Hirtella corymbosa</i> Cham. & Schlttdl.	SAMES-7944	FM	187		
			GM	375		
Dilleniaceae	<i>Davilla morii</i> Aymard.	SAMES-7953	FDM	375		
			FM	187		
			GM	187		
Fabaceae (Faboideae)	<i>Andira fraxinifolia</i> Benth.	SAMES-7945	FDM	375		
			FM	187		
			GDM	187		
			GM	187		
		<i>Swartzia simplex</i> var. <i>continentalis</i> Urb.	SAMES-7951	GDM	187	
			GM	375		
Lauraceae	<i>Ocotea notata</i> (Nees & Mart.) Mez.	SAMES-7942	FDM	375		
			FM	375		
			GDM	375		
			GM	187		
Melastomastaceae	<i>Miconia cinnamomifolia</i> (DC.) Naudin	SAMES-7952	FM	375		
Myrtaceae	<i>Myrciaria strigipes</i> O. Berg.	SAMES-7932	GM	375		
			<i>Eugenia brejoensis</i> Mazine	SAMES-7937	FDM	93
				FM	375	
		<i>Eugenia astringens</i> Cambess	SAMES-7911	FDM	23	
			FM	93		
			GDM	46		

			GM	187
Polygonaceae	<i>Coccoloba alnifolia</i> Casar.	SAMES-7933	FM	375
			GM	375
Sapindaceae	<i>Cupania emarginata</i> Cambess.	SAMES-7935	FM	187
			GDM	375
			GM	375
Sapotaceae	<i>Manilkara subsericea</i> (Mart.) Dubard.	SAMES-7943	FM	187
			GDM	375
			GM	93

FDM: extrato de folha em DCM:MeOH; FM: extrato metanólico de folhas; GDM: extrato de galho em DCM:MeOH; GM: extrato metanólico de galho, PADM: extrato de parte aérea com DCM:MeOH; PAM: extrato metanólico da parte aérea.

Muitos dos extratos mantiveram os valores mínimos de inibição obtidos na triagem inicial, confirmando a CIM de 375 µg/mL apresentada na Tabela 1. Outros tiveram estes valores reduzidos para 187 µg/mL, como todos os extratos testados de *Byrsonima sericea*, o extrato FM de *Cupania emarginata*, GM de *Ocotea notata*, FM de *Hirtella corymbosa*, FM, GDM e GM de *Andira fraxinifolia*, GDM de *Swartzia simples* e FM e GM de *Davilla morii*. Extratos de *Eugenia brejoensis*, *Eugenia astringens*, e *Manilkara subsericea* destacaram-se com os menores valores de CIM. Dentre esses extratos, o de folhas em DCM:MeOH de *E. astringens* destacou-se como o mais promissor (CIM de 23 µg/mL), que foi selecionado para fracionamento bioguiado. O extrato metanólico dessa espécie também apresentou baixo valor de CIM (93 µg/mL), juntamente com os extratos metanólicos de folhas de *E. brejoensis* e galhos de *M. subsericea* (Tabela 2).

3.2 Fracionamento bioguiado e prospecção fitoquímica de *Eugenia astringens*

Após o fracionamento de EBEa, a fração hexânica (HFEa) foi a que apresentou maior rendimento (35,4%), indicando que o extrato possui considerável quantidade de compostos de natureza lipofílica. As classes de metabólitos secundários presentes no extrato e nas frações, de acordo como os resultados obtidos na prospecção fitoquímica por CCD, estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 – Prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada do extrato e frações de folhas de *E. astringens*.

Classes	EBEa	HFEa	DFEa	EFEa	BFEa	WFEa
Fenólicos	+	+	+	+	+	+
Óleo essencial	+	+	+	-	-	-
Triterpeno e esteroide	+	-	-	+	+	-
Flavonoide	+	+	+	+	+	-
Cumarinas	-	-	-	-	-	-
Antraquinona	-	-	-	-	-	-
Alcaloide	-	-	-	-	-	-
Saponina	+	-	-	+	+	-

(+) presença; (-) ausência. EBEa: Extrato DCM:MeOH de folhas de *E. astringens*, HFEa: Fração hexânica, DFEa: Fração diclorometânica, EFEa: Fração em acetato de etila, BFEa: Fração butanólica, WFEa: Fração aquosa.

Dentre as classes detectadas em EBEa estão os fenólicos, óleos essenciais, triterpenos e esteroides, flavonoides e saponinas. Compostos fenólicos estão presentes em todas as frações. Já os óleos essenciais, estão presentes apenas na fração hexânica e diclorometânica. Triterpenos e esteroides foram detectados na fração em acetato de etila e butanólica. A classe dos flavonoides está ausente apenas na fração aquosa.

3.3 Determinação da CIM do extrato e frações de *Eugenia astringens*

A CIM de EBEa e das frações obtidas a partir dele foi determinada seguindo protocolo descrito anteriormente. Nessa investigação, foram selecionadas seis espécies Gram-positivas do gênero *Staphylococcus* e as bactérias Gram-negativas *S. enteritidis* ATCC 13706 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Tabela 5). No entanto, nenhuma fração foi efetiva na inibição do crescimento dessas bactérias Gram-negativas, que, normalmente, são mais resistentes a ação antibiótica devido a limitada permeabilidade da membrana celular.

Tabela 4 – Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato e frações de *E. astringens* frente a bactérias *Staphylococcus*.

Amostras	CIM (µg/mL)					
	<i>S. aureus</i> ATCC-29213	<i>S. epidermidis</i> ATCC-359883	<i>S. intermedius</i> ATCC-29663	<i>S. hyicus</i> ATCC-11249	<i>S. chromogenes</i> ATCC-5607	<i>S. aureus</i> (USA300)
EBEa	23	23	11	0,7	0,7	5
HFEa	5	23	11	0,3	0,7	2,9
DFEa	11	23	11	0,7	1,4	5
EFEa	187	187	93	2,9	23	93
BFEa	1500	1500	750	23	187	1500
WFEa	>1500	>1500	1500	375	1500	>1500

EBEa: Extrato de folhas DCM:MeOH de *Eugenia astringens*; HFEa: Fração hexânica da PLL; DFEa: Fração diclorometânica; EFEa: Fração em acetato de etila, BFEa: Fração butanólica; WFEa: Fração aquosa; ATCC - *American Type Culture Collection*.

Para todas as bactérias testadas, EBEa foi eficiente em inibir o crescimento, exibindo menores valores de MIC para *S. hyicus*, *S. chromogenes* e *S. aureus* (Tabela 5). Igualmente, as frações testadas foram muito eficientes na inibição do crescimento das bactérias, com destaque para a HFEa, cujos compostos bioativos possuem caráter hidrofóbico, sendo por isso extraídos em solvente mais apolar. Sobre *S. hyicus*, foram obtidos os menores valores de MIC para todas as amostras testadas. A estirpe *S. hyicus* ATCC 11249 é o agente etiológico causador da epidermite exudativa em suínos, mas também está associada a infecções em cavalos e bovinos (Calcutt et al., 2015). Destaca-se também os valores de MIC obtidos sobre *S. chromogenes*, espécie mais prevalente associada a mastite em rebanho leiteiro (Tomazi et al., 2014; Srednik et al., 2015).

O uso de extratos e óleos essenciais, como alternativa ao tratamento convencional da mastite bovina, tem demonstrado ser promissor no controle de agentes patogênicos *in vitro* (Lopes et al., 2020). Os óleos essenciais são constituídos principalmente por compostos monoterpênicos, sesquiterpênicos e fenilpropanoides, em diferentes concentrações, sendo para vários desses atribuídos ação antimicrobiana (Burt, 2004). Esses compostos, em associação com antibióticos, podem, em alguns casos, exibir efeito sinérgico, apresentando uma atividade maior do que quando ministrados isoladamente (Gouvea; Rosenthal; Ferreira, 2017). O uso de extratos vegetais no tratamento de mastite subclínica apresentam como vantagens

o menor efeito secundário e a baixa resistência após exposição prolongada (Kher; Sheth; Blatt, 2019; Montironi et al., 2016).

Estudos sobre o efeito antibacteriano de óleos essenciais de *Eugenia* spp. têm sido relatados. *E. caryophyllata* apresentou atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (Oussalah et al., 2007; Silvestri et al., 2010). Além disso, extratos desta espécie também inibiram o crescimento de *Helicobacter pylori*, com valores de CIM entre 40 e 60 µg/mL (Li et al., 2005). Extratos de *E. uniflora* e de *E. malaccensis* também apresentam relato de atividade antibacteriana (Moura et al., 2018; Locher et al., 1995). Os óleos essenciais de *E. umbeliflora*, sinônimo de *E. astringens*, e de *E. brasiliensis* mostraram atividade antibacteriana contra *S. aureus*, com valores de CIM de 119 e 156 µg/mL, respectivamente (Magina et al., 2009). É importante destacar que a CIM obtida para extratos de *E. astringens* sobre *S. aureus* (23 µg/mL) é bem inferior a estes relatados.

3.4 Caracterização química da fração FHEa por CG-EM

Pela análise por cromatografia gasosa de FHEa (Figura 1) foi possível verificar a presença de uma mistura de compostos sesquiterpênicos.

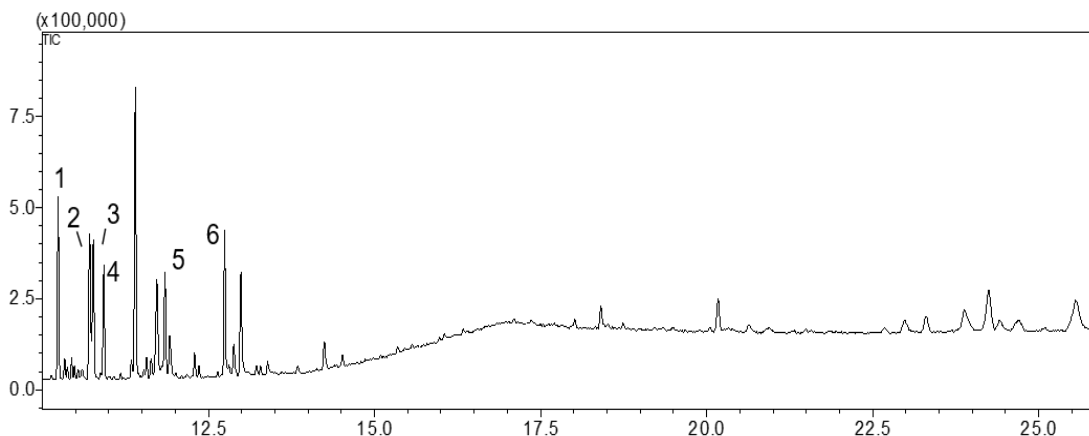


Figura 1: Cromatograma de íons totais da fração FHEa obtido por CG-EM.

A Tabela 5 mostra a identidade dos compostos sesquiterpênicos presentes na fração ativa HFEa, que provavelmente fazem parte do óleo essencial de *E. astringens*, cuja presença foi detectada pela prospecção fitoquímica

Tabela 5 – Constituintes químicos identificados por CG-EM da Fração HFEa

Picos	t _R *(min)	Compostos	Fórmula molecular	Similaridade (%)
1	10.237	β-cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	95
2	10.712	2-metileno-5-(1-metilvinil) -8-metil- Biciclo [5.3.0]decano	C ₁₅ H ₂₄	94
3	10.768	α-Guaieno	C ₁₅ H ₂₄	92
4	10.925	cis-Calameneno	C ₁₅ H ₂₂	92
5	11.846	viridifloreno	C ₁₅ H ₂₄	89
6	12.744	Fitol acetato	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	91

* t_R: Tempo de retenção em minutos.

Entre os sesquiterpenos identificados está o β-cariofileno, um composto bicíclico com atividades antibacteriana, anti-inflamatória, anticâncer, analgésica e antioxidante já relatadas (Koyama et al., 2019; Fidyt et al., 2016; Ames-Sibin et al., 2018). Moo et al. (2020) descreve a atividade antibacteriana desse composto frente a *Bacillus cereus*, revelando que β-cariofileno foi capaz de alterar a permeabilidade e integridade da membrana, levando a danos e vazamento de conteúdo intracelular. Atividade antibacteriana também tem sido relatada para os sesquiterpenos viridifloreno (Trong et al., 2020) e fitol (Islam et al., 2018).

Dessa forma, existe forte indício de que os compostos sesquiterpenos presentes na fração ativa HFEa estejam relacionados com a atividade antibacteriana de *E. astringens*.

3.5 Análise da interação do extrato ou fração hexânica com antibióticos

Considerando o resultado obtido na inibição de USA 300, a sua resistência a diferentes antimicrobianos e seu impacto na saúde pública mundial, investigou-se a possibilidade de sinergia de EBEa e HFEa com antibióticos de diferentes classes (Tabela 5).

Tabela 6 - Avaliação do tipo de interação entre EBEa ou HFEa com antibióticos sobre MRSA USA 300.

Antibióticos CIM ($\mu\text{g/mL}$)	EBEa		HFEa	
	ΣFIC^*	Interação	ΣFIC^*	Interação
Ofloxacina 0,48	0,375	Sinérgica	0,375	Sinérgica
Gentamicina 0,48	0,625	Aditiva	0,750	Aditiva
Penicilina 15,6	0,625	Aditiva	0,625	Aditiva
Ampicilina 31,2	2,125	Indiferente	2,125	Indiferente
Ceftriazona 62,4	1,250	Indiferente	0,750	Aditiva
Cefaclor 15,6	0,750	Aditiva	0,625	Aditiva

*FIC: Concentração Inibitória Fracionária; EBEa: Extrato de folhas DCM:MeOH de *E. astringens*; HFEa: Fração hexânica.

Os resultados revelam uma interação sinérgica entre o antibiótico ofloxacina e os compostos antibacterianos presentes em EBEa e HFEa para MRSA USA 300. Houve uma redução de 4 vezes no valor de CIM para ofloxacina ($0,48\mu\text{g/mL}$ para $0,12\mu\text{g/mL}$) quando combinada com $1/8$ da CIM de EBEa ou HFEa ($0,625\mu\text{g/mL}$ ou $0,36\mu\text{g/mL}$ respectivamente). Isso mostra que o efeito combinado é maior do que a atividade antibacteriana isolada dos compostos (Rand et al., 1993, Kobilinsky et al., 2007).

A interação de EBEa com gentamicina, penicilina ou cefaclor foi classificada como aditiva, já para ampicilina e ceftriazona a interação foi indiferente. Interação do tipo aditiva foi observada também na combinação de HFEa com os antibióticos gentamicina, penicilina, ceftriazona e cefaclor. A interação de HFEa com ampicilina foi indiferente.

O mecanismo exato para a redução das concentrações dos antibióticos quando combinados com antimicrobianos naturais é desconhecido. Outros trabalhos corroboram que óleos essenciais vegetais são efetivos na interação sinérgica com antibióticos, o que garante maior eficiência contra bactérias resistentes.

Lahmar et al. (2017) investigaram o potencial antibacteriano de óleos essenciais de três espécies de plantas norte-africanas (*Pituranthos chloranthus*,

Teucrium ramosissimum e *Pistacia lentiscus*) isoladamente e em combinação com antibióticos. Os óleos essenciais foram altamente eficazes na redução da resistência de *S. aureus* quando associados a meticilina, amoxicilina, tetraciclina, piperacilina, ofloxacina e oxacilina. Os resultados também comprovaram sinergismo entre os óleos essenciais e ofloxacina e novobiocina contra a *E. coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido.

A ação sinérgica entre EBEa e HFEa com o antibiótico ofloxacina, indica um potencial de *E. astringens* para tratamento de infecções causadas por USA 300.

4 CONCLUSÕES

Foi demonstrado o potencial de *Eugenia astringens* como fonte de produtos naturais antibacterianos. Descrevemos a forte inibição do extrato e fração hexânica (HFEa) de *E. astringens* sobre bactérias do gênero *Staphylococcus*, incluindo MRSA USA 300. Essa atividade pode estar associada aos compostos sesquiterpenicos identificados na fração bioativa HFEa. Esses compostos, certamente, compõem o óleo essencial desta espécie. Destacamos que os valores da CIM obtidos neste trabalho, são inferiores aos relatados em outros estudos para óleos essenciais de *E. astringens* e de outras espécies do gênero. A ação sinérgica entre o extrato e fração com o antibiótico ofloxacina, indica um potencial para tratamento de infecções causadas por USA 300.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Outorga: GD 142313 / 2015-7) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; Outorga: CDS - APQ-02540-15) pelo apoio financeiro. Ao Laboratório de Educação Ambiental (LabEA) e ao herbário-SAMES da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES, campus São Mateus) pela logística nas expedições à campo, identificação botânica e depósito das exsicatas. Ao Instituto Estadual de Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos (IEMA) do Espírito Santo pela autorização das coletas do material vegetal e ao Parque Estadual de Itaúnas pelo apoio nas expedições.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses potencial.

REFERENCIAS

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, 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.

AMES-SIBIN, A.P.; BARIZÃO, C.L.; CASTRO-GHIZONI, C.V.; SILVA, F.M.S.; SÁ-NAKANISHI, A.B.; BRACHT, L.; BERSANI-AMADO, C.A.; MARÇAL-NATALI, M. R.; BRACHT, A.; COMAR, J. F. β -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. *J. Cell Biochem.*, 119(12):10262-10277, 2018.

BARTON, D. M. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews*, 13, p. 279-299. 2000.

BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V.; Molecular Mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 13(1), p. 42-51, 2015.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253, 2004.

CAESAR, L.K.; CECH, N.B. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Nat Prod Rep.*, 36(6):869-888, 2019.

CALCUTT, M.J.; FOECKING, M. F.; HSIEH, H-Y.; ADKIM, P.R.F.; STEWART, G. C.; MIDDLETON, J.R. Sequence analysis of *Staphylococcus hyicus* ATCC 11249 an etiological agents of exudative epidermitis in swine, reveals a type VII secretion system locus and a novel 116-kilobase genomic island harboring toxin-encoding genes. *Genome Announcements*, v.3(1) e01525-14. 2012.

CHEESMAN, M. J.; ILANKO, A.; BLONK, B.; COCK, I. E.. Developing new antimicrobial therapies: Are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? *Pharmacogn Rev.* 11(22):57-72, 2017.

DEFAVERI, A.C.A.; SATO, A.; BORRÉ, L.B.; AGUIAR, D.L.M.; SAN GIL, R. A. S.; ARRUDA, R.C.O.; RIEHL, C.A.S. *Eugenia neonitida* Sobral and *Eugenia rotundifolia* Casar. (Myrtaceae) Essential oils: Composition, Seasonality influence, antioxidant activity and leaf histochemistry. *J. Braz. Chem.*, v.22(8): 1531-1538, 2011.

FIDYT, K.; FIEDOROWICZ, A.; STRZAŁA, L.; SZUMNY, A. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Med.*, 25(10):3007-3017, 2016.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas. Centro de Ciências Aplicadas à Biodiversidade, Belo Horizonte, 2005.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 21: 263-277, 2004.

GOUVEA, F.; ROSENTHAL, A.; FERREIRA, E. H. Plant extract and essential oils added as antimicrobials to cheeses: a review. *Cienc. Rural*, 47, e 20160908, 2017.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: a importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HAGEMAN, J.C.; UYEKI, T.M.; FRANCIS, J.S.; JERNIGAN, D.B.; WHEELER, J.G.; BRIDGES, C.B.; BARENKAMP, S.J.; SIEVERT, D.M.; SRINIVASAN, A.; DOHERTY, M.C.; MCDUGAL, L.K.; KILLGORE, G.E.; LOPATIN, U.A.; COFFMAN, R.; MACDONALD, J.K.; MCALLISTER, S.K.; FOSHEIM, G.E.; PATEL, J.B.; MCDONALD, L.C. Severe community-acquired pneumonia due to *Staphylococcus aureus*, 2003-04 influenza season. *Emerg Infect Dis.*, 12(6):894-9., 2006.

HARBONE, J.B. *Phytochemical Methods. A guide to Modern Techniques of Plant analysis*. Londres. Chapman and Hall. p. 288, 1984.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A.K.; DOBLE, M. Sinergismo entre produtos naturais e antibióticos contra doenças infecciosas. *Phytomedicine*, 15: p. 639 – 652, 2008.

INUI, T.; WANG, Y.; DENG, S.; SMITH, D. C.; FRANZBLAU, S. G.; PAULI, G. F. Counter-current chromatography based analysis of synergy in an anti-tuberculosis ethnobotanical. *J Chromatogr A.*, 1151 (1-2): 211–5, 2007.

ISLAM, M. T.; ALI, E. S.; UDDIN, S. J.; SHAW, S.; ISLAM, M. A.; AHMED, M. I.; SHILL, M. C.; KARMAKAR, U.K.; YARLA, N.S.; KHAN, I. N.; BILLAH, M. M.; PIECZYNSKA, M. D.; ZENGIN, G.; MALAINER, C.; NICOLETTI, F.; GULEI, D.; BERINDAN-NEAGOE, I.; APOSTOLOV, A.; BANACH, M.; YEUNG, A. W. K, EL-DEMERDASH, A.; XIAO, J.; DEY, P.; YELE, S.; JÓŹWIK, A.; STRZAŁKOWSKA, N.; MARCHEWKA, J.; RENGASAMY, K. R. R.; HORBAŃCZUK, J.; KAMAL, M. A.; MUBARAK, M. S.; MISHRA, S. K; SHILPI, J. A; ATANASOV, A. G. *Phytol: A review of biomedical activities*. *Food Chem Toxicol.*, 121:82-94, 2018.

KHER, M. N.; SHETH, N. R.; BLATT, V.D. In vitro antibacterial evaluation of *Terminalia chebula* as an alternative of antibiotics against bovine subclinical mastitis. *Animal Biotechnology*, v. 30, p. 151-158, 2019.

KOBILINSKY, A.; NAZER, A.I.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Modeling the inhibition of *Salmonella typhimurium* growth by combination of food antimicrobials. *Int J Food Microbiol.*, 115(1):95-109. 2007.

KOYAMA, S.; PURK, A.; KAUR, M.; SOINI, H.A.; NOVOTNY, M.V.; DAVIS, K.; KAO, C.C.; MATSUNAMI, H.; MESCHER, A. Beta-caryophyllene enhances wound healing through multiple routes. *PLoS One.*,14(12):e0216104, 2019.

KRAKER, M. E. A.; STEWARDSON, A. J.; HARBARTH, S. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Med* 13 (11): e1002184, 2016.

LAGO, J.H.G.; SOUZA, E.D.; MARIANE, B.; PASCON, R.; VALLIM, M.A.; MARTINS, R.C.C.; BAROLI, A.A.; CARVALHO, B.A.; SOARES, M.G.; SANTOS, R.T.; SARTORELLI, P. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of Myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. *Molecules*, v.16, p.9827-9837, 2011.

LAHMAR, A.; BEDOUI, A.; MOKDAD-BZEOUICH, I.; DHAOUIFI, Z.; KALBOUSSI, Z.; CHERAIF, I.; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Reversal of resistance in bacteria underlies synergistic effect of essential oils with conventional antibiotics. *Microbial Pathogenesis*, v. 106: 50-59, 2017.

LAKEMEYER, M.; ZHAO, W.; MANDL, F.A.; HAMMAN, P.; SIEBER, S. A. Thinking outside the box-novel antibacterials to tackle the resistance crisis. *Angew. Chem.*, 130: 14642-14682, 2018.

LI, Y.; XU, C.; ZHANG, Q.; LIU, J.Y.; TAN, R.X. In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, v.98, p. 329–333, 2005.

LIVERMORE, D. M. Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66(9): 1941-1944, 2011.

LOCHER, C.P.; BURCH, M.T.; MOWER, H.F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; VAN POEL, B.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE, D.A.;VLIETINCK, A.J. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*,17;49(1):23-32, 1995.

LOPES, T. S.; FONTOURA, P. S.; OLIVEIRA, A.; RIZZO, F. A.; SILVEIRA, S.; STRECK, A. F. Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*, 131, p. 186-193, 2020.

MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, E. M.; WISNIEWSKI, A.; SIMIONATTO, E. L.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. *Journal of Natural Medicines*, v. 63(3), 345-350, 2009.

MONTIRONI, I.D.; CARIDDI, L.N.; REINOSO, E.B. Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. *Rev. Argent. Microbiol.* 48, 210 - 216, 2016.

MOO, C.L.; YANG, S.K.; OSMAN, M.A.; YUSWAN, M.H.; LOH, J.Y.; LIM, W.M.; LIM, S.H.; LAI, K.S. Antibacterial Activity and Mode of Action of β -caryophyllene on *Bacillus*

cereus. Pol J Microbiol., 69(1):1-6, 2020.

MOURA, G.S.; OLIVEIRA, I.J.; BONOME, L. T. S.; FRANZENER, G. EUGENIA uniflora L.: potential uses as a bioactive plant. Arq. Inst. Biol., v.85, 1-9, e0752017, 2018.

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.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. J. Nat. Prod. Mar., 27;83(3):770-803, 2020.

O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations [Internet]. Rev Antimicrob Resist, 2014.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 52 , p. 1, 2003.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

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.

QUEIROZ, J.M.G.; SUZUKI, M.C.M.; MOTTA, A.P.R.; NOGUEIRA, J.M.R.; CARVALHO, E.M. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. Revista Fitos, Rio de Janeiro, v. 9(2): 73-159, 2015.

RAND, K.H.; HOUCK, H.J.; BROWN, P.; BENNETT, D. Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. Antimicrob Agents Chemother. 37(3):613-5, 1993.

ROBINSON, T. P.; BU, D.P.; CARRIQUE-MAS, J.; FÈVRE, E. M.; GILBERT, M.; GRACE, D.; HAY, S. I.; JIWAKANON, J.; KAKKAR, M.; KARIUKI, S.; LAXMINARAYAN, R.; LUBROTH, J.; MAGNUSSON, U.; THI NGOC, P.; VAN BOECKEL, T. P.; WOOLHOUSE, M. E. A resistência aos antibióticos é o problema de saúde fundamental por excelência. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 110 (7), 377-380, 2016.

SENGELOV, G; AGERSO, Y.; HALLING-SORENSEN, B.; BALODA, B. S.; ANDERSEN, J. S.; JENSEN, L. B. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. Ambient International, 28, p. 587-595, 2003.

SILVESTRI, Jandimara Doninelli Fior et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). Rev. Ceres, v. 57(5), p. 589-594, 2010.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA (SiBBR). *Eugenia astringens* in Ficha de Espécies. Disponível em: <https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/eugenia_astringens>. Acesso em 11-03-2021.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012.

SONI, I.; CHAKRAPANI, H.; CHOPRA, S. Draft Genome Sequence of Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Genome Announc.* 3 (5): e01095-15, 2015.

SREDNIK, M.E.; GRIEBEN, M.A.; BENTANCOR, A.; GENTILINI, E.R. Molecular identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis and detection of β -lactam resistance. *J. Infect. Dev. Ctries*, v.9, p.1022-1027, 2015.

TOMAZI, T.; GONÇALVES, J.L.; BARREIRO, J.R. et al. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, v.52, p.1658-1663, 2014.

TRONG LE, N.; VIET HO, D.; QUOC DOAN, T.; TUAN LE, A.; RAAL, A.; USAI, D.; MADEDDU, S.; MARCHETTI, M.; USAI, M.; RAPPELLI, P.; DIAZ, N.; ZANETTI, S.; NGUYEN, H.T.; CAPPUCINELLI, P.; DONADU, M. G. In vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil Extracted from Leaves of *Leoeo domatiophorus* Chaowasku, D.T. Ngo and H.T. Le in Vietnam. *Plants (Basel)*, 9(4):453, 2020.

VAN BOECKEL, T. P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A.; ROBINSON, T. P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl Acad. Sci.* 112(18):5649-5654, 2015.

VAN VUUREN, S.F. Antimicrobial activity of south african medicinal plants, *Journal of ethnopharmacology*, 119: 432-472, 2008.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant drug analysis - A thin layer chromatography atlas*. 2.ed. Berlim: Springer, 384 p, 1996.

WHO - World Health Organization World. Antibiotic Awareness Week. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/events/2015>> Access: 10/18/15.

ZHAO, W.H.; HU, Z.Q.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Inibição da penicilinase por galato de epigalocatequina, resultando na restauração da atividade antibacteriana da penicilina contra *Staphylococcus aureus* produtor de penicilinase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, pp. 2266 – 2268, 2002.

CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho foi avaliado o potencial anticolinesterásico e antibacteriano de 114 extratos de 30 espécies vegetais. O extrato de folhas de *M. strigipes* apresentou o maior percentual de inibição para as enzimas AChE e BChE. Em uma fração enriquecida de flavonoides dessa planta observou-se um incremento da atividade inibitória contra AChE, obtendo-se percentual de inibição de 83%. Este resultado sugere que a atividade anticolinesteráica está relacionada a compostos flavonoídicos. Contudo, novos estudos são necessários para identificação dos inibidores e avaliação de seu mecanismo de ação.

Com relação a atividade antibacteriana a espécie *Eugenia astringens* destacou-se. O extrato e fração hexânica (HFEa) de *E. astringens* apresentou atividade sobre bactérias do gênero *Staphylococcus*, incluindo MRSA USA 300. A atividade antibacteriana pode estar associada aos compostos sesquiterpenicos identificados na fração HFEa. Esses compostos possivelmente compõem o óleo essencial de *E. astringens*. Destacamos que os valores da CIM obtidos neste trabalho, são inferiores aos relatados em outros estudos para óleos essenciais de *E. astringens* e de outras espécies do gênero. A ação sinérgica entre o extrato e fração com o antibiótico ofloxacina, indica um potencial para tratamento de infecções causadas por USA 300.

ANEXOS

Anexo 1 – Autorização de pesquisa concedida pelo Instituto Estadual do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos (IEMA-ES).



GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO
Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos
Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos - IEMA

Folha nº 1/4

AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA GRN nº 031-2017

(Processo nº 79057004/17)

Título da Pesquisa: Avaliação do Potencial Terapêutico de Metabólitos Secundários de Plantas de Restinga para o tratamento de Doença de Alzheimer.

Unidade de Conservação: Parque Estadual de Itaúnas - PEI

Pesquisadores responsáveis: João Paulo V. Leite e Elisa Mitsuko Aoyama

Equipe:

- | | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| 1. Ana Paula Agrizzi | 5. Amílcar Saporeti Jr |
| 2. Elisa Mitsuko Aoyama | 6. Ezinete Moreira do Rozário |
| 3. Marcos da Cunha Teixeira | 7. Janini do Rozário Conceição |
| 4. Marilena Cordeiro F de Jesus | |

Com fundamento no Parecer Técnico CCEUC nº 029-2017, decidimos pelo DEFERIMENTO do pedido de autorização de pesquisa solicitado por meio do Processo nº 79057004.

Esta autorização é válida até **31 de julho de 2021**, estando a mesma condicionada ao cumprimento no disposto abaixo. Informamos que os prazos de entrega dos relatórios Parciais são: **30 de junho de 2018**, **30 de junho de 2019**, **30 de junho de 2020**, e do relatório Final é **30 de junho de 2021**.

Informamos que as campanhas de campo deverão ser agendadas, **em dia útil e até o horário de 16:00**, junto à administração da unidade de conservação através dos seguintes contatos: pei@iema.es.gov.br ou parquedeitaunas@gmail.com e/ou (27) 3762-5196

Condicionantes Específicas:

- | | |
|----|---|
| 1. | Ressaltamos que, quando da realização das atividades de campo, é obrigatório o porte desta autorização (original ou cópia) para segurança do pesquisador. |
|----|---|

Anexo 2 – Comprovante de cadastro de acesso ao patrimônio genético junto ao Sistema Nacional do Patrimônio Genético e do Conhecimento tradicional Associado (SisGen).



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A381FA0

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A381FA0
Usuário:	UFV
CPF/CNPJ:	25.944.455/0001-96
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Stigmaphyllon ciliatum
Annona glabra
Maytenus obtusifolia
Byrsonima sericea
Cordia taguahyensis
Protium heptaphyllum
Hancornia speciosa
Myrciaria strigipes
Coccoloba alnifolia
Himatanthus phagedaenicus
Cupania emarginata
Maytenus distichophylla
Eugenia brejoensis
Protium icicariba
Psychotria bahiensis
Piper arboreum
Eugenia astringens
Ilex integerrima
Ocotea notata
Manilkara subsericea
Hirtella corymbosa
Andira fraxinifolia
Herreria glaziovii
Sorocea hilarii
Conchocarpus insignis
Cordia glabrifolia
Swartzia simplex

Miconia cinnamomifolia

Davilla morii

Dichorisandra procera

Título da Atividade:

Análise química e avaliação biológica de extratos vegetais oriundos do estado do Espírito Santo

Equipe

João Paulo Viana Leite

UFV

Ana Paula Agrizzi

Universidade Federal de Viçosa

Parceiras Nacionais

32.479.123/0001-43 / Universidade Federal do Espírito Santo

Data do Cadastro:

10/06/2019 19:45:05

Situação do Cadastro:

Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **19:46** de **10/06/2019**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**