



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO PROF. ANTÔNIO GARCIA FILHO  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

BIANCA DA SILVA ROCHA BATISTA

**ISOLAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Mesosphaerum*  
*pectinatum* BIOGUIADO POR ENSAIOS ANTIMICROBIANOS FRENTE A CEPAS  
DE *Staphylococcus aureus***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Lagarto/SE  
Abril, 2018

BIANCA DA SILVA ROCHA BATISTA

**ISOLAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Mesosphaerum pectinatum* BIOGUIADO POR ENSAIOS ANTIMICROBIANOS FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Sergipe, Campus Professor Antônio Garcia Filho, como requisito para a obtenção do Diploma de Graduação em Farmácia.

**Orientador:** Prof. Dr. James Almada da Silva  
**Co-orientador:** Prof. Dr. Rafael Ciro Marques Cavalcante

Lagarto/SE  
Abril, 2018

BIANCA DA SILVA ROCHA BATISTA

**ISOLAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Mesosphaerum pectinatum* BIOGUIADO POR ENSAIOS ANTIMICROBIANOS FRENTE À CEPAS DE *Staphylococcus aureus***

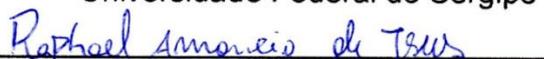
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Sergipe, Campus Professor Antônio Garcia Filho, como requisito para a obtenção do Diploma de Graduação em Farmácia.

**Orientador:** Prof. Dr. James Almada da Silva  
**Co-orientador:** Prof. Dr. Rafael Ciro Marques Cavalcante

Aprovado em: 30 / 04 / 18

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Rafael Ciro Marques Cavalcante**

Universidade Federal de Sergipe

  
\_\_\_\_\_  
**Me. Raphael Amancio de Jesus**

Universidade Federal de Sergipe

*“Se você pode fazer algo, ou sonha que pode, comece a fazê-lo. A ousadia traz inspiração, força e magia consigo. Decida-se e veja a sua vida progredir.”*

*(Johann Wolfgang von Goethe)*

## **AGRADECIMENTOS**

Deus esteve comigo desde o primeiro dia e por isso agradeço todo apoio, força e segurança que me ajudaram a alcançar esta grande meta.

O aprendizado não é um caminho que se possa trilhar sozinho, e o meu não foi diferente, assim agradeço a todos que de alguma forma participaram desse processo.

Em especial ao meu orientador, Prof. Dr. James Almada da Silva, por sua acolhida, anos atrás, no início desse caminho. Obrigada por acreditar na minha capacidade, pela paciência e dedicação constante, principalmente nos momentos difíceis e por todo o conhecimento transmitido.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rafael Ciro Marques Cavalcante, pela disposição e contribuições durante todo o desenvolvimento deste estudo.

Aos meus companheiros de laboratório, Maraiza Alves, Marianne Andrade, Tailane Caína, Heitor Dikson e Reinan Nascimento agradeço pela amizade, companheirismo e pela ajuda de todos vocês durante os dias cansativos que enfrentamos no laboratório no decorrer dos nossos anos de pesquisa.

Aos meus pais, Margareth Rocha e Cosme Geraldo, pelo exemplo de vida, pelo amor, sobretudo pela presença marcante em todos os momentos da minha vida e pelo empenho na minha educação.

Ao meu irmão Tiago Rocha, pelo carinho, compreensão, força e amizade.

Á toda a minha família e aos meus amigos de verdade eu quero que saibam que este trabalho foi fruto de muita dedicação. Quero que finalmente entendam que todos os momentos que deixei de estar ao lado de vocês foi porque precisava me dedicar ao laboratório desenvolvendo esta pesquisa. Foram férias, feriados, finais de semana que tive que abrir mão e que fazia tudo novamente. Obrigada a todos vocês pela força que inculiram no meu pensamento para não desistir e o conforto de saber

que nunca estarei só e serei sempre capaz de tudo por maiores que sejam as dificuldades.

Aos técnicos do Laboratório de Farmácia da UFS – Lagarto, Francisco Silva, Edisleide Menezes e Vítor Amorim por sempre estarem dispostos e não medirem dificuldades para me ajudar. Sou muito grata a vocês.

Ao Laboratório de Química da UFS – São Cristóvão, pela parceria e ajuda nas análises realizadas.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar e ao Laboratório de Química da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, pela parceria e colaboração nas análises. Aos amigos que lá fiz, durante a minha curta passagem, Welma Beatriz, Luciano Ribeiro, Luciano Pinto e Airton Damasceno, obrigada pelo acolhimento, disponibilidade, conhecimentos compartilhados e ajuda prestada.

A COPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Muito obrigada a todos!

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A *Mesosphaerum pectinatum* (Lamiaceae), popularmente conhecida como "sambacaitá" é extensivamente utilizada pela população para o tratamento de inflamações, infecções bacterianas e dor, na forma de decocção e infusão. Apesar de algumas substâncias da *M. pectinatum* já terem sido avaliadas biologicamente, ainda há muito a se explorar. Uma alternativa para obter compostos puros e biologicamente ativos a partir de extratos de plantas é através do estudo bioguiado, onde conforme o fracionamento é executado, as frações e subfrações obtidas são submetidas a ensaios avaliando onde a atividade biológica está concentrada.

**OBJETIVO:** Isolar e identificar compostos, presentes nas folhas e/ou flores de *M. pectinatum*, que apresentem atividade antimicrobiana. **METODOLOGIA:** Extratos e frações de *M. pectinatum* foram testados contra cepas de *Staphylococcus aureus* utilizando o método da difusão em ágar. Os extratos da parte mais ativa da planta foram fracionados por partição líquido-líquido e cromatografia líquida clássica (CLC). As frações mais biotivas foram analisadas e seus constituintes isolados por HPLC. Para a elucidação estrutural das substâncias isoladas, análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foram realizadas. **RESULTADOS:** A fração hexânica (mais ativa) proveniente das folhas de *M. pectinatum* foi refracionada por CLC gerando sete novas frações. Estas foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana e a subfração mais ativa foi submetida a mais um fracionamento por CLC. Em seguida suas subfrações obtidas foram submetidas a análise por HPLC para posterior isolamento e avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias isoladas. Após análise por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  das substâncias isoladas, identificou-se os triterpenos: ácido micromérico – isolado nesta espécie pela primeira vez; ácido oleanólico e ursólico. Após avaliação da atividade antimicrobiana verificou-se uma elevada inibição do crescimento microbiano (CIM 100  $\mu\text{g/mL}$ ) para o ácido ursólico, enquanto que as outras substâncias não apresentaram efeito inibitório na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ . **CONCLUSÃO:** Estes resultados contribuem para explicar o uso popular desta espécie como agente terapêutico, no entanto, estudos mais aprofundados (*in vitro* e *in vivo*) deverão ser realizados para que possam ser avaliadas sua efetividade e toxicidade.

**Palavras-chave:** Sambacaitá, isolamento bioguiado, triterpenos.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** *Mesosphaerum pectinatum* (Lamiaceae), popularly known as "sambacaitá" is extensively used by the population for the treatment of inflammation, bacterial infections and pain, in the form of decoction and infusion. Although some *M. pectinatum* substances have already been evaluated biologically, there is still much to explore. An alternative to obtain pure and biologically active compounds from plant extracts is through the bioguided study, whereas the fractionation is performed, the fractions and subfractions obtained are submitted to tests discovering where the biological activity is concentrated. **OBJETIVE:** To isolate and identify compounds, present in leaves and/or flowers of *M. pectinatum*, that present antimicrobial activity. **METHODS:** Extracts and fractions of *M. pectinatum* were tested on strains of *Staphylococcus aureus* using the agar diffusion method. The extracts from the most active part of the plant were fractionated by liquid-liquid partition and classical liquid chromatography (CLC). The most bioactive fractions were analyzed and their constituents isolated by HPLC. For the structural elucidation of the isolated substances, analyzes by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance (NMR) were performed. **RESULTS:** The hexane fraction (more active) from the leaves of *M. pectinatum* was refracted by CLC generating seven new fractions. These were evaluated for antimicrobial activity and the most active subfraction was submitted to a further CLC fractionation. Subsequently, its subfractions were submitted to HPLC analysis for further isolation and evaluation of the antimicrobial activity of the isolated substances. After analysis by  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR of the isolated substances, the triterpenes: micromeric acid - isolated in this species for the first time were identified; oleanolic and ursolic acid. After the evaluation of the antimicrobial activity, a high inhibition of microbial growth (MIC 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was observed for ursolic acid, while the other substances had no inhibitory effect at 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . **CONCLUSION:** These results contribute to explain the popular use of this species as a therapeutic agent, however, further studies (in vitro and in vivo) should be performed in order to evaluate its effectiveness and toxicity.

**Keywords:** Sambacaitá, bioguided isolation, triterpenes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotografia da espécie <i>M. pectinatum</i> , onde se observa um ramo com folhas e inflorescências.....	10
Figura 2: Estruturas químicas dos pectinolídeos e hyptolideo.....	11
Figura 3: Estruturas químicas dos triterpenóides ácido oleanólico e ácido ursólico..	12
Figura 4: Fluxograma do fracionamento bioguiado do extrato das folhas de <i>M. pectinatum</i> .....	19
Figura 7: Imagens ilustrativas do processo de partição líquido-líquido da MPF com <i>n</i> -hexano (A), diclorometano (B) e acetato de etila (C). ....	24
Figura 6: Estrutura química do ácido micromérico. ....	38
Figura 7: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) do ácido micromérico.....	38
Figura 8: Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) do ácido micromérico.....	39
Figura 9: Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 100 MHz) do ácido micromérico.....	39
Figura 10: Estrutura química do ácido oleanólico.....	41
Figura 11: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) do ácido oleanólico. ....	41
Figura 12: Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) do ácido oleanólico. ....	42
Figura 13: Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 100 MHz) do ácido oleanólico. ....	42
Figura 14: Estrutura química do ácido ursólico. ....	43
Figura 15: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) do ácido ursólico. ....	44
Figura 16: Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) do ácido ursólico. ....	44
Figura 17: Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 100 MHz) do ácido ursólico.....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade de extratos e substâncias isoladas da espécie <i>M. pectinatum</i> frente à <i>Leishmania brasiliensis</i> , LB; <i>Staphylococcus aureus</i> , SA; <i>Bacillus subtilis</i> , BS; <i>Escherichia coli</i> , EC; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , PA; <i>Candida albicans</i> , CA. ....	14
Tabela 2: Atividade anti-estaflococos de substâncias isoladas da espécie <i>M. pectinatum</i> .....	15
Tabela 3: Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o Ácido micromérico (1) e seu éster metílico ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz).....	40
Tabela 4: Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o Ácido oleanólico (2) e Ácido ursólico (3) (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	46

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efeito dos extratos obtidos por turboextração das folhas e das flores da <i>M. pectinatum</i> , frente à cepa de <i>S. aureus</i> . .....	23
Gráfico 2: Efeito dos extratos obtidos por turboextração das folhas e das flores da <i>M. pectinatum</i> , frente à cepa de <i>S. aureus</i> resistente a metilicina.. .....	23
Gráfico 3: Efeito da fração hexânica (MPFH) obtida por Partição líquido-líquido da <i>M. pectinatum</i> frente à cepa de <i>S. aureus</i> .....	25
Gráfico 4: Efeito da fração hexânica (MPFH) obtida por Partição líquido-líquido da <i>M. pectinatum</i> frente à cepa de <i>S. aureus</i> resistente a metilicina.. .....	25
Gráfico 5: Efeito das subfrações (MPFHA-MPFHG) na concentração de 60µg/disco obtidas por CLC da <i>M. pectinatum</i> frente à cepa <i>S. aureus</i> .....	27
Gráfico 6: Efeito das subfrações (MPFHA-MPFHG) na concentração de 60µg/disco obtidas por CLC da <i>M. pectinatum</i> frente à cepa <i>S. aureus</i> resistente a metilicina...28	
Gráfico 7: Efeito da subfração MPFHG frente às cepas <i>S. aureus</i> e <i>S. aureus</i> resistente a metilicina.....	29
Gráfico 8: Cromatograma da fração MPFHGE obtida a partir de HPLC em escala analítica.....	31
Gráfico 9: Cromatograma da fração MPFHGF obtida a partir de HPLC em escala analítica. ....	31
Gráfico 10: Cromatograma da fração MPFHGG obtida a partir de HPLC em escala analítica. ....	32
Gráfico 11: Cromatograma da fração MPFHGH obtida a partir de HPLC em escala analítica.....	32
Gráfico 12: Cromatograma da fração MPFHGI obtida a partir de HPLC em escala analítica.....	33
Gráfico 13: Cromatograma da fração HPFHGF-G obtido em HPLC em semi-preparativo. ....	34
Gráfico 14: Cromatograma da fração HPFHGF-G obtido em HPLC em semi-preparativo. ....	35
Gráfico 15: Cromatograma da fração HPFHGF-G obtido em HPLC em semi-preparativo.. .....	35
Gráfico 16: Efeito do ácido ursólico frente à cepa <i>S. aureus</i> resistente a metilicina. 48	

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA .....	4
2.1	Plantas medicinais.....	4
2.1.1	As plantas como antibióticos .....	5
2.3	Família Lamiaceae .....	8
2.4	Gênero <i>Mesosphaerum</i> .....	8
2.5	<i>Mesosphaerum pectinatum</i> .....	9
2.6	Metabólitos secundários da <i>M. pectinatum</i> .....	10
2.6.1	Atividades biológicas de <i>M. pectinatum</i> .....	13
3.	OBJETIVOS .....	16
4.	METODOLOGIA.....	17
4.1	Preparação do extrato vegetal.....	17
4.2	Extração por turboextração .....	17
4.3	Fracionamento líquido-líquido do extrato bruto de <i>M. pectinatum</i> .....	17
4.4	Fracionamento e isolamento dos metabólitos secundários através da cromatografia líquida clássica e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	18
4.5	Resumo do fracionamento cromatográfico da <i>M. Pectinatum</i> .....	19
4.6	Identificação das substâncias isoladas por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear .....	20
4.7	Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar .....	20
4.9	Análise Estatística .....	21
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1	Ensaio antimicrobianos com os extratos brutos das folhas e flores da <i>M. pectinata</i> (MPF e MPFL) .....	22
5.2	Ensaio antimicrobianos realizados com as frações obtidas após partição líquido-líquido do extrato das folhas da <i>M. pectinatum</i> .....	24
5.3	Fracionamento da fração MPFH e ensaios de atividade antimicrobiana das subfrações obtidas .....	26
5.4	Fracionamento da subfração MPFHG e análise do perfil cromatográfico das subfrações obtidas de MPFHG utilizando HPLC.....	30
5.5	Dados espectroscópicos das substâncias isoladas das folhas da <i>M. pectinatum</i> .....	37

5.6	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias isoladas.....	47
6.	CONCLUSÃO.....	50
7.	REFERÊNCIAS.....	51

## 1. INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a utilização popular das plantas medicinais é evidente em todo o mundo, no entanto é nos países em desenvolvimento que sua prática é mais efetiva, pois grande parte da população é de baixa renda e, em sua maioria, esse grupo não possui acesso aos medicamentos industrializados, recorrendo assim, ao uso de plantas medicinais (OLIVEIRA et al., 2010). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente 88% da população de países em desenvolvimento – como, por exemplo, o Brasil – faz uso da medicina à base de extratos de plantas. Além disso, muitas vezes, o conhecimento sobre plantas medicinais representa a única opção terapêutica para muitas comunidades (OLIVEIRA et al., 2011).

Na indústria farmacêutica, as plantas têm contribuído significativamente, seja pelo uso de matérias-primas para a fabricação de chás ou de forma mais complexa através do isolamento de varias substâncias bioativas (TROVÃO et al., 2004). O desenvolvimento de fármacos derivados de fontes naturais tem concentrado esforços em novas categorias de anticancerígenos, antimicrobianos e antivirais (BAHIA, 2002). O uso indiscriminado de antibióticos pela população tem causado sérios problemas de saúde pública pelo mundo inteiro devido ao fato dos microrganismos terem a capacidade de desenvolver resistência a agentes terapêuticos (NASCIMENTO et al., 2000). A resistência microbiana é um problema que cresce cada vez mais, revelando um aumento alarmante na incidência de doenças infecciosas novas e reemergentes. Tal fato impulsiona a busca por novas substâncias antimicrobianas, com novos mecanismos de ação, a partir de fontes naturais, incluindo as plantas (NASCIMENTO et al., 2000; RAJENDRAN et al., 2009).

Em resposta a resistência bacteriana, indústrias farmacêuticas, juntamente com as universidades, têm concentrado esforços em isolar e identificar novos compostos com propriedades antibacterianas (TAYLOR, 2002). Os produtos naturais têm sido fontes valiosas para o desenvolvimento desses novos compostos (NEWMAN, 2000), permitindo a descoberta de agentes terapêuticos não somente para tratar doenças infecciosas, mas também para tratar o câncer, imunodeficiências e outras patologias (CLARD, 2004).

O reino vegetal vem contribuindo de forma significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, com diversidade e complexidade única. Nos últimos anos mais de 100.000 substâncias originadas de plantas foram isoladas e identificadas, sendo que esse número cresce anualmente. Muitas dessas substâncias são consumidas diariamente na forma de alimentos, cosméticos e medicamentos. Algumas destas apresentam comprovada ação farmacológica tanto em estudo pré-clínico quanto clínicos e constituem modelos para desenvolvimento de medicamentos sintéticos ou semi-sintéticos (SERAFIN, 2006).

CARVALHO (1999) e CRUZ (2002) num levantamento etnofarmacológico no semiárido de Sergipe, citaram uma variedade de plantas utilizadas para diversos fins. Dentre as quais, CRUZ (2002) mencionou o potencial antimicrobiano de algumas delas, a exemplo: a sambacaitá (*Mesosphaerum pectinatum* (L.) Poit.).

A sambacaitá é uma espécie aromática que ocorre naturalmente de forma selvagem em campos, matas e estradas e em volta de residências nos estados de Sergipe e Alagoas. A utilização dessa planta limita-se ao uso popular, sendo comum sua presença em hortas e jardins, porém o extrativismo é a forma usual de obtenção. É de grande importância em muitas comunidades por apresentar propriedades antibacterianas, antimicótica e antitussígena, sendo utilizada contra febres, doenças de pele, distúrbios gástricos, rinofaringite e congestão pulmonar. Quanto às formas de preparo, registraram-se técnicas como: infusão, decocção, xarope, garrafadas, compressas, banhos, cataplasmas, tintura, além do uso na dieta e bochechos. (FALCÃO, 2003).

Todas as evidências do uso tradicional da *M. pectinatum* aliadas aos resultados de inibição de crescimento microbiano dos extratos e metabólitos secundários desta espécie a tornam bastante atrativa para a investigação mais detalhada dos seus efeitos terapêuticos e da busca das substâncias responsáveis por tais efeitos.

A combinação da abordagem quimiosistemática e etnofarmacológica torna ainda mais eficiente o método de escolha da espécie a ser estudada. Além disso, a utilização de técnicas direcionadas para o isolamento de substâncias químicas ou frações de extratos de plantas através de *screening*, seguido de prospecção direcionada por bioensaio, também conhecida como “estudo químico de plantas medicinais orientado pela análise biológica” (CALIXTO, 2001) ou estudo bioguiado, são essenciais para a obtenção de bons resultados com uma relação interessante

de custo-benefício. Essa relação de benefício é vista através da redução de tempo e menor gasto de materiais, quando comparado a outros modelos descritos na literatura, pois durante o isolamento e seleção dos compostos, estes são monitorados diretamente pela atividade biológica de interesse (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991; MARTINEZ et al., 1996; RITCH-KRC et al., 1996).

Desta forma, contribuindo com o estudo fitoquímico da espécie *M. pectinatum*, devido à escassez de estudos com essa espécie, e para a descoberta de novos compostos bioativos, este trabalho propôs avaliar a atividade antimicrobiana e investigar os constituintes químicos existentes nas folhas e/ou flores da planta. Estes ensaios contribuíram para a busca de novas substâncias e para confirmar os efeitos já observados por alguns autores, e por diversos povos que utilizam esta planta para tratar infecções bacterianas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Plantas medicinais

O conhecimento que o homem tem sobre as propriedades medicinais das plantas resulta de uma triagem realizada ao longo de muitos anos. A utilização de plantas medicinais como um recurso terapêutico, tem se mostrado cada vez mais elevada, devido ao seu baixo custo, à busca por tratamentos menos agressivos e por sua compatibilidade cultural, em determinadas regiões do País (RIBEIRO et al., 2005). Contudo, desde 1977, a Organização Mundial de Saúde tem incentivado o estudo de plantas tradicionalmente conhecidas como medicinais, com o objetivo de avaliar cientificamente seus benefícios e os riscos de seu uso indevido (LOGUERCIO et al., 2005).

A partir do século XIX, tornou-se crescente o emprego de substâncias ativas isoladas de plantas, os chamados “princípios ativos”, tomando impulso à química orgânica, a partir da síntese dessas substâncias ativas presentes nas plantas medicinais (SCHENKEL et al., 2000).

O mercado farmacêutico disponibiliza alguns medicamentos de sucesso terapêutico, que apresentam em sua composição como princípio ativo, substâncias purificadas a partir de extratos vegetais denominados fitofármacos, dos quais vários foram descobertos a partir do conhecimento da medicina tradicional (GILANI et al., 2005) e que até hoje são amplamente utilizados na clínica, como exemplo, a morfina, a emetina, a vincristina, a colquicina, a rutina, etc.

Assim, a partir de estudos de plantas medicinais utilizadas pela medicina popular, busca-se compilar informações úteis, a fim de desenvolver cientificamente pesquisas farmacológicas e fitoquímicas propiciando redução de tempo e viabilidade econômica, incorporando sua utilização, com eficácia e segurança, ao conjunto de terapias, no intuito de fornecer novas substâncias, enriquecendo o arsenal terapêutico.

### 2.1.1 As plantas como antibióticos

A resistência microbiana é cada vez mais preocupante, comprometendo-se o futuro de novas drogas antimicrobianas. Por isso, ações devem ser dirigidas buscando minimizar esse problema, tais como um maior controle no uso de antibióticos; contínuas pesquisas para melhor entender os mecanismos genéticos de resistência, e por último ampliar os estudos para obtenção de novas drogas naturais, semissintéticas ou sintéticas. Deve-se ainda considerar o problema da baixa imunidade por parte dos pacientes e o surgimento de cepas bacterianas multirresistentes que acarretam infecções com alta mortalidade, principalmente, em hospitais (NASCIMENTO et al., 2000; STAPLETON et al., 2004).

Há uma considerável necessidade por novas classes de agentes antimicrobianos para contra atacar o rápido aumento da transmissão das multidrogas resistentes (MDR), através de compartilhamento genético de bactérias patogênicas, ou não, ao homem, podendo ocorrer entre bactérias da mesma família ou de famílias diferentes. Em particular, a ocorrência e proliferação de MDR em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) é uma das maiores causas de interesse, no âmbito clínico, justificado diretamente pelo baixo efeito dos agentes terapêuticos que podem ser usados frente a estes organismos (GIBBONS et al., 2002).

Muitas das propriedades terapêuticas das plantas são relatadas pela população, sendo confirmadas em sua maioria através estudos científicos. Tais propriedades proporcionam o desenvolvimento de vários fármacos, sejam estes obtidos por síntese a partir de molécula protótipo ou através do isolamento. Devido a todos estes aspectos, existe um interesse crescente na utilização e pesquisa de plantas medicinais para fins terapêuticos aliadas, ainda, a boa aceitabilidade destes produtos no mercado farmacêutico e as altas cifras que circundam a comercialização de fitomedicamentos desde a última década (SIMÕES & SCHENKEL, 2002).

No tratamento de infecções comuns, muitas plantas são utilizadas no Brasil sob forma de extrato bruto, infusões ou emplastos, porém sem nenhuma evidência científica da sua eficácia (PESSINI et al., 2003). As pesquisas dirigidas à obtenção de novas drogas com atividade antimicrobiana ocorrem em diversas partes do

mundo, sendo que boa parte destas, se referem a ativos oriundos de vegetais. É de importante interesse, principalmente no Brasil, com a grande diversidade de sua flora, fazer um “*screening*” das espécies vegetais, principalmente aquelas de uso popular, evidenciando por testes laboratoriais a atividade dos extratos brutos e prosseguindo com um estudo bioguiado para avaliar as propriedades das diferentes frações obtidas.

## **2.2 *Staphylococcus aureus***

As bactérias Gram positivas são as maiores causadoras de infecções adquiridas tanto na comunidade quanto hospitalares. A resistência aos agentes antimicrobianos é prevalente entre muitas destas bactérias, em diversos países. Dentre as bactérias Gram positivas, destaca-se o gênero *Staphylococcus*, sendo os *Staphylococcus aureus* seu principal representante, justificado pela importância clínica, devido à prevalência e resistência destas cepas aos antimicrobianos utilizados na terapêutica das infecções que afetam os homens (PALOMBO & SEMPLE, 2002).

O *S. aureus* é um patógeno que pode ser encontrado na flora de 30 a 70% da população (LINDSAY & HOLDEN, 2004), colonizando a pele úmida em diferentes regiões (narinas, axilas, períneo e intestino) de pessoas saudáveis onde podem permanecer colonizando por longos períodos sem causar nenhuma patologia infecciosa, porém em determinadas circunstâncias e conjuntamente a seus fatores de virulência exibem sua patogenicidade, podendo invadir o organismo do indivíduo provocando infecções frequentemente agudas e piogênicas. Assim, entre as infecções da pele provocadas por este, destaque-se pela frequência: o furúnculo, a celulite, o impetigo, bem como infecções cirúrgicas, pós-operatórias (CORBELLA et al., 1997).

O *S. aureus* produz duas toxemias graves: a síndrome da pele escaldada, pela ação de toxinas esfoliativas e a síndrome do choque-tóxico – TSST, além de ser responsável por intoxicações alimentares, cuja origem está relacionada à produção de superantígenos, as enterotoxinas (CORDEIRO, 2004).

Ainda, *S. aureus* apresenta uma variedade relativamente grande de proteínas extracelulares e polissacarídeos, alguns dos quais estão correlacionados com sua virulência. Resultando em efeitos combinados de muitos fatores expressos no curso da infecção (PEREIRA, 2002), que juntamente com seu amplo arsenal genético, lhes dão a possibilidade de adaptar-se as variações bruscas (JONGE et al., 1994).

A importância das infecções nosocomiais produzidas por *S. aureus*, principalmente *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), é bem reconhecida pela sua frequência, morbidade, mortalidade e principalmente pela dificuldade de tratamento. Este agente microbiano é um patógeno emergente e suas infecções são consideradas como enfermidades emergentes. Estas enfermidades são aquelas que têm surgido recentemente na população ou já existentes com pequenos casos, mas aumentaram rapidamente em incidência e/ou em extensão geográfica (NASCIMENTO et al., 2000).

Historicamente, a emergência de cepas de *S. aureus* com altos níveis de resistência a penicilina foi seguido pelo desenvolvimento e aumento da resistência às penicilinas semisintéticas (meticilina, oxacilina, nafcilina), aos macrolídeos, as tetraciclina, as aminoglicosídeos determinando que a terapêutica das infecções estafilocócicas constituam um desafio global (SADERI et al., 2005).

No Brasil, os *S. aureus* são os microrganismos mais frequentemente isolados e sua prevalência ocorre em maior proporção a nível hospitalar, acima de 80% e cerca de 70% dos isolados comunitários apresentam resistência às penicilinas naturais, e por extensão, à ampicilina e amoxicilina. Estes isolados são geralmente resistentes a múltiplos antibióticos (aminoglicosídeos, cloranfenicol, tetraciclina, lincosamidas, macrolídeos, quinolonas, sulfametoxazol/trimetoprima), com grande susceptibilidade a rifampicina (TAVARES, 2000).

A resistência destas bactérias aos antimicrobianos é ainda de grande interesse econômico, cujo impacto eleva os custos com a saúde pública e privada, visto o maior tempo de internação, o uso de drogas mais potentes e caras (PALOMBO & SEMPLE, 2002).

## 2.3 Família Lamiaceae

A família Lamiaceae tem grande importância econômica por ser fonte de óleos essenciais aromáticos e de plantas ornamentais. Muitas espécies são condimentos importantes em culinária, sendo apreciadas pelo aroma ou pelo sabor que comunicam aos alimentos, bem como importância etnofarmacológica, cujos conhecimentos são transmitidos de geração a geração (FALCÃO, 2003).

Esta família apresenta cerca de 250 gêneros diferentes e é composto por ervas, subarbustos, arbustos e, raramente, árvores pequenas. Os caules geralmente são quadrangulares, as folhas opostas, simples ou, mais raramente, partidas, pecioladas, sésseis ou curtamente pedunculadas, contendo substâncias aromáticas. As plantas pertencentes a este gênero oferecem elevado potencial terapêutico em virtude dos seus diversos metabólitos secundários bioativos (FALCÃO, 2013).

## 2.4 Gênero *Mesosphaerum*

O gênero *Mesosphaerum* (Lamiaceae) é formado por aproximadamente 400 espécies distribuídas desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina. Este gênero apresenta grande interesse econômico devido à presença de óleos essenciais e de metabólitos secundários com atividade biológica comprovada (FALCÃO, 2003; FRAGOSO-SERRANO, 2005; SANTOS, 2008; ALONSO-CASTRO, 2011; PINHEIRO, 2015). Algumas espécies de *Mesosphaerum* vêm sendo utilizados pelos povos de diversos países para tratar doenças infecciosas, distúrbios gastrointestinais, febre, resfriados, tosse, conjuntivite, rinfaringite etc. Todo o conhecimento popular do uso de espécies desse gênero vem sendo passado de geração em geração, por esses povos, ao longo dos anos (FALCÃO, 2003).

Como outras espécies do gênero, a *M. pectinatum* é reconhecida como planta medicinal de grande importância em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. Na Tanzânia, as folhas são usadas contra tosse e como cataplasma em furúnculos, enquanto que no Oeste da Índia, as folhas são utilizadas na forma de chá, para dores estomacais (BOALINO et al., 2003). Formulações da *M. pectinatum* são usadas na medicina popular como remédio doméstico de múltipla finalidade

(FRAGOSO-SERRANO et al., 2005). No Nordeste do Brasil a planta é popularmente utilizada para diferentes enfermidades, tais como rinofaringites, desordens gástricas e anti-inflamatórias (BISPO et al., 2001). Pesquisas comprovaram efeitos antinociceptivos (ARRIOGONI-BLANK et al., 2008) e antiedematogênico do extrato aquoso de folhas (BISPO et al., 2001) além da atividade antimicrobiana do óleo essencial (ASEKUN et al., 1999).

## **2.5 *Mesosphaerum pectinatum***

A espécie *Mesosphaerum pectinatum*, popularmente conhecida como “canudinho” ou “sambacaitá” é uma espécie utilizada pela medicina tradicional para os mesmos fins terapêuticos relatados para o gênero *Mesosphaerum* (Figura 1). É uma espécie aromática, em Sergipe e Alagoas essa planta ocorre naturalmente de forma selvagem em campos, matas e estradas e em volta de residências, sendo vastamente utilizada para problemas gastrintestinais. É um arbusto perene com galhos eretos, e baixa densidade foliar (BISPO et al., 2001).

A utilização dessa planta limita-se ao uso popular, sendo comum sua presença em hortas e jardins, porém o extrativismo é a forma usual de obtenção, o que na maioria das vezes, tem acarretado em perdas mesmo antes de serem estudadas. O seu uso mais frequente é a ingestão na forma de chás (decoções ou infusões) e bochechos, sendo considerado um anti-inflamatório natural (CARVALHO, 1999). No estado de Sergipe a *M. pectinatum* é extensivamente utilizada pela população local para o tratamento de inflamações, infecções bacterianas, dor e câncer (BISPO et al., 2001).



**Figura 1:** Fotografia da espécie *M. pectinatum*, onde se observa um ramo com folhas e inflorescências. (Fonte: <http://www.tropicos.org/Image/100168567>).

## **2.6 Metabólitos secundários da *M. pectinatum***

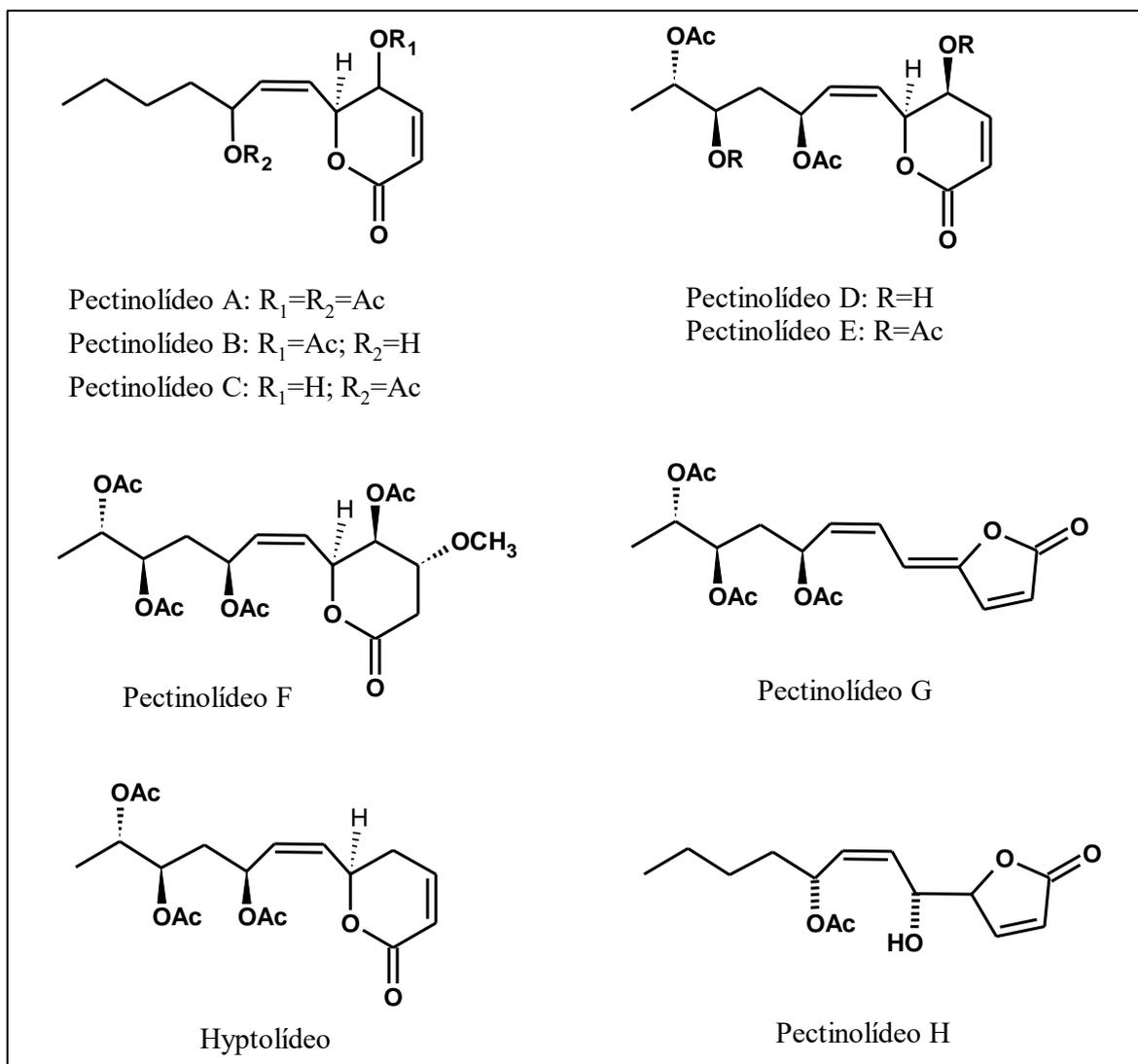
O metabolismo representa o conjunto de reações químicas que está sempre ocorrendo em cada célula. Os compostos químicos que são formados, degradados ou transformados recebem o nome de metabólitos (SIMÕES et al., 2010), que por sua vez podem ser divididos em metabólitos primários e metabólitos secundários (WAKSMUNDZKA-HAJNOS et al., 2008).

Metabólitos secundários são substâncias produzidas em pequenas quantidades, e, em contraste com os primários, nem sempre estão envolvidos em funções vitais do vegetal ou mesmo presente em todos eles. Além disto, são conhecidos por serem sintetizados em tipos celulares especializados e em distintos estágios de desenvolvimento, tornando seu isolamento e purificação mais trabalhosos. Estes constituintes químicos são extremamente diversos. Cada família, gênero, e espécie produz uma categoria química característica ou uma mistura delas, e elas, por vezes, podem ser utilizadas como caracteres taxonômicos na classificação das plantas (BELL et al., 1980; WAKSMUNDZKA-HAJNOS et al., 2008).

Os pectinolídeos são os metabólitos secundários que estão em maior quantidade nas partes aéreas de *M. pectinatum*. Dentre as substâncias testadas, o

pectinolídeo A merece destaque por ter apresentado, de forma geral, as melhores atividades antibacterianas, e a melhor atividade citotóxica em células de carcinoma de nasofaringe (PEREDA-MIRANDA, 1993; FALCÃO, 2013). Além do pectinolídeo A, outros pectinolídeos que ainda não foram avaliados biologicamente devem ser estudados para se descobrir suas possíveis atividades.

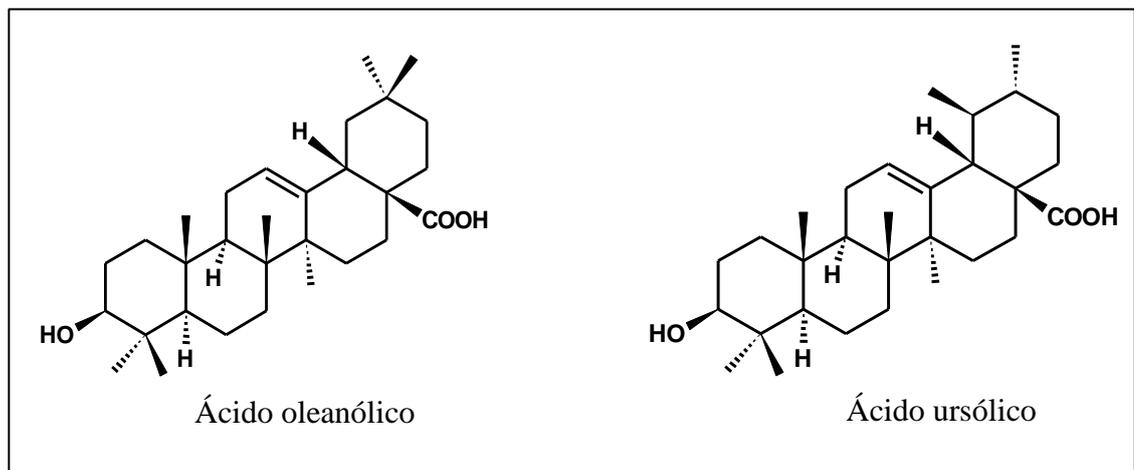
As estruturas químicas dos pectinolídeos A, B, C, hyptolideo (PEREDA-MIRANDA, 1993) e os pectinolídeos D, E, F e G (BOALINO, 2003) e o pectinolídeo H (FRAGOSO-SERRANO, 2005), substâncias isoladas da espécie *M. pectinatum* e que são metabólitos que podem ser utilizados como marcadores químicos desta espécie (Figura 2).



**Figura 2:** Estruturas químicas dos pectinolídeos e hyptolideo.

Em pesquisa realizada por Basílio e colaboradores (2006), há confirmação da presença de constituintes químicos no extrato aquoso da *M. pectinatum*, como monoterpenos, sesquiterpenos, lactonas e triterpenóides, com importantes propriedades farmacológicas. Os triterpenos pentacíclicos são metabolitos secundários amplamente distribuído no reino vegetal e são frequentemente usados em fitoterapia devido às suas propriedades terapêuticas valiosas.

Dentre os triterpenos pentacíclicos já isolados nesta espécie, destacam-se o ácido ursólico e seu isômero, ácido oleanólico (Figura 3) que são amplamente distribuídos no reino vegetal (VASCONCELOS, 2006).



**Figura 3:** Estruturas químicas dos triterpenóides ácido oleanólico e ácido ursólico.

Durante a última década muitos artigos foram publicados, refletindo o grande interesse e progresso no entendimento destes triterpenóides. Isso inclui o isolamento e purificação de várias plantas, modificações químicas, pesquisas farmacológicas e estudos toxicológicos. Contudo, é observado que triterpenos de esqueleto oleanano apresentam atividade biológica menor que os triterpenos com esqueleto ursano e lupano (VECHIA, 2009). Alguns de seus derivados são mais ativos que o próprio ácido oleanólico, contudo, mesmo assim apresenta propriedades biológicas maiores que outros triterpenos como o lupeol (SPORN, 2000, VECHIA, 2009).

O ácido ursólico tem atraído considerável interesse devido as suas promissoras propriedades biológicas como quimioterápico, quimiopreventivo, anti-

inflamatório (influenciando a ação do óxido nítrico sintase e ciclo-oxigenase), antimicrobiana, e inibidor de mutação em bactérias. Além disso, derivados do ácido ursólico, especialmente os dicarboxilados, exibem atividade frente ao vírus HIV (embora seja levemente tóxico), através da inibição da dimerização da protease. Também exibem atividade citotóxica inibindo o crescimento de células tumorais *in vivo*, sendo um potencial candidato para tratamento e prevenção de câncer de pele e melanoma por indução a apoptose (VECHIA, 2009; DENG, 2008; LEUNG, 1996).

Dentre as inúmeras atividades biológicas atribuídas aos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico, diferentes estudos relatam a atividade analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante (VASCONCELOS et al., 2003; KANG et al., 2008; IKEDA et al., 2008).

### 2.6.1 Atividades biológicas de *M. pectinatum*

Extratos da espécie *Mesosphaerum pectinatum* e alguns de seus metabólitos secundários já foram ensaiados frente a alguns micro-organismos. ROJAS e colaboradores (1992) relataram a atividade antimicrobiana de diversas plantas medicinais utilizadas no México, incluindo a *M. pectinatum*. Na Tabela 1 podem ser observados os resultados de atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária de alguns extratos e substâncias isoladas de *M. pectinatum*. Os metabólitos secundários isolados de *M. pectinatum* mais ativos, frente a quatro espécies de bactérias e uma de fungo foram os pectinolídeos A, B e C. As três substâncias apresentaram resultados positivos de inibição de crescimento microbiano, frente a *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Já para a atividade antiparasitária frente à *Leishmania brasilienses* testaram-se diversos fenilpropanoides isolados de *M. pectinatum*. O mais ativo, com valor de IC<sub>50</sub> de 5,4 mg/mL foi o ácido 3-O-metil-rosmarínico.

De Queiroz e colaboradores (2014) avaliaram os efeitos frente a *L. brasilienses* do extrato aquoso de *M. pectinatum*. Os resultados demonstraram que este extrato (100 µg/mL) inibiu o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonenses* em 81,9%. Estes resultados corroboram com os encontrados por Falcão e colaboradores (2013).

**Tabela 1:** Atividade de extratos e substâncias isoladas da espécie *M. pectinatum* frente à *Leishmania brasiliensis*, LB; *Staphylococcus aureus*, SA; *Bacillus subtilis*, BS; *Escherichia coli*, EC; *Pseudomonas aeruginosa*, PA; *Candida albicans*, CA.

Amostras	Atividade antimicrobiana						Referências
	IC <sub>50</sub> μg/mL	Zona de inibição (mm)/MIC (μg/mL)					
		LB	SA	BS	EC	PA	
Extrato MeOH (partes aéreas)	-	6/-	10/-	Inativo	Inativo	Inativo	Rojas, 1992
Extrato CHCl <sub>3</sub> (partes aéreas)	-	8,5/-	8,5/-	Inativo	Inativo	Inativo	Pereda-Miranda, 1993
Hyptolideo	-	Inativo	45/5	Inativo	Inativo	Inativo	Pereda-Miranda, 1990
Pectinolideo A	-	8/12,5	10/6,25	Inativo /200	Inativo /200	Inativo /250	Pereda-Miranda, 1993
Pectinolideo B	-	4/100	6/25	Inativo /300	Inativo /300	Inativo /300	
Pectinolideo C	-	4/100	8/12,5	Inativo />500	Inativo />500	Inativo />500	
Hyptolideo	-	Inativo />100	5/100	Inativo />500	Inativo />500	Inativo />500	
Extrato EtOH (Folhas)	0,7	-	-	-	-	-	Falcão, 2013
Fração MeOH:H <sub>2</sub> O (Folhas)	3,9	-	-	-	-	-	
Fração AcOEt (Folhas)	0,4	-	-	-	-	-	
Fração Hexano (Folhas)	0,2	-	-	-	-	-	
Ácido sambacaitárico	6,9	-	-	-	-	-	
Ácido 3-O-metil-sambacaitárico	>100	-	-	-	-	-	
Ácido rosmarínico	>100	-	-	-	-	-	
Ácido 3-O-metil-rosmarínico	5,4	-	-	-	-	-	
Cafeato de etila	>100	-	-	-	-	-	
Nepetoidina	>100	-	-	-	-	-	

A avaliação dos efeitos tóxicos nas células do hospedeiro é um critério muito importante na busca de compostos ativos frente a *L. amazonenses*. Desta forma, de Queiroz e colaboradores (2014) verificaram que o extrato aquoso de *M. pectinatum* não apresentou efeitos citotóxicos em macrófagos de camundongos.

Na Tabela 2 pode-se observar os resultados de ensaios antimicrobianos com alguns pectinolídeos, realizados em quatro cepas de *S.aureus*, e de citotoxicidade frente a linhagem celular de carcinoma de nasofaringe. FRAGOSO-SERRANO e colaboradores (2005) realizaram ensaios de citotoxicidade na linhagem de carcinoma de nasofaringe (KB). Todos os quatro pectinolídeos foram ativos, no entanto o pectonilídeo A foi o mais efetivo tanto em KB, como nas linhagens de *S. aureus*.

**Tabela 2:** Atividade anti-estafilococos de substâncias isoladas da espécie *M. pectinatum*.

Amostras	Células de carcinoma de nasofaringe e KB (ED <sub>50</sub> , µg/mL)	Atividade antimicrobiana (MIC, µg/mL)				Referências
		ATCC 25923	XU212	SA1199B	EMRSA15	
Pectinolideo A	0,63	32	128	128	128	Fragoso-Serrano, 2005
Pectinolideo B	>20	128	256	256	256	
Pectinolideo C	2,52	64	256	128	128	
Pectinolideo H	>20	32	64	64	64	

XU212 e SA1199B: cepas de *Staphylococcus aureus multi-resistentes*  
 EMRSA15: cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina

### 3. OBJETIVOS

Isolar e identificar metabólitos secundários da espécie *Mesosphaerum pectinatum* bioguiado por ensaio antimicrobiano frente às cepas de *Staphylococcus aureus*.

#### Objetivos específicos

- (a) Preparar extrato etanólico das folhas e flores da espécie *M. pectinatum* por turboextração;
- (b) Realizar o fracionamento dos extratos e frações mais ativas utilizando técnicas cromatográficas clássicas;
- (c) Isolar metabólitos secundários de *M. pectinatum* utilizando técnicas cromatográficas clássicas e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- (d) Identificar os metabólitos secundários isolados, pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear;
- (e) Avaliar as atividades antimicrobianas, do extrato, frações e substâncias isoladas, em cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Preparação do extrato vegetal**

A coleta do material botânico para identificação foi realizada de acordo com as técnicas usuais de MORI et al (1985) e posteriormente identificado no Herbário ASE da Universidade Federal de Sergipe, com auxílio de bibliografia especializada (Número de identificação, 34.715). A *Mesosphaerum pectinatum* foi coletada no Povoado Tombo, município de Salgado/SE.

Em seguida as folhas e inflorescências foram selecionadas e desidratadas em estufa com circulação forçada de ar, a uma temperatura de 40°C, triturado, tamisados e, armazenado em frascos hermeticamente fechados para posterior extração.

### **4.2 Extração por turboextração**

O material vegetal seco e pulverizado foi submerso em etanol 99,5% em erlenmeyers na proporção de 1:5, m/v (material vegetal seco em gramas/volume em mL de solvente) e submetido à agitação em homogeneizador de tecido celular (Turrtec®) por 5 min, a 18.000 rpm e 30°C. O solvente foi filtrado e em seguida evaporado sob vácuo em evaporador rotativo, a 40°C. Este procedimento foi realizado mais duas vezes para o esgotamento dos metabólitos. Finalmente o extrato foi armazenado para as análises posteriores.

### **4.3 Fracionamento líquido-líquido do extrato bruto de *M. pectinatum***

O fracionamento do extrato etanólico foi realizado por partição líquido-líquido, em funil de separação, com os solventes *n*-hexano, diclorometano e acetato de etila. O processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridade crescente, visa uma separação das substâncias através de suas diferentes polaridades. As frações

obtidas foram concentradas a 40°C em rotaevaporador, e submetidas aos ensaios antimicrobianos.

#### **4.4 Fracionamento e isolamento dos metabólitos secundários através da cromatografia líquida clássica e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

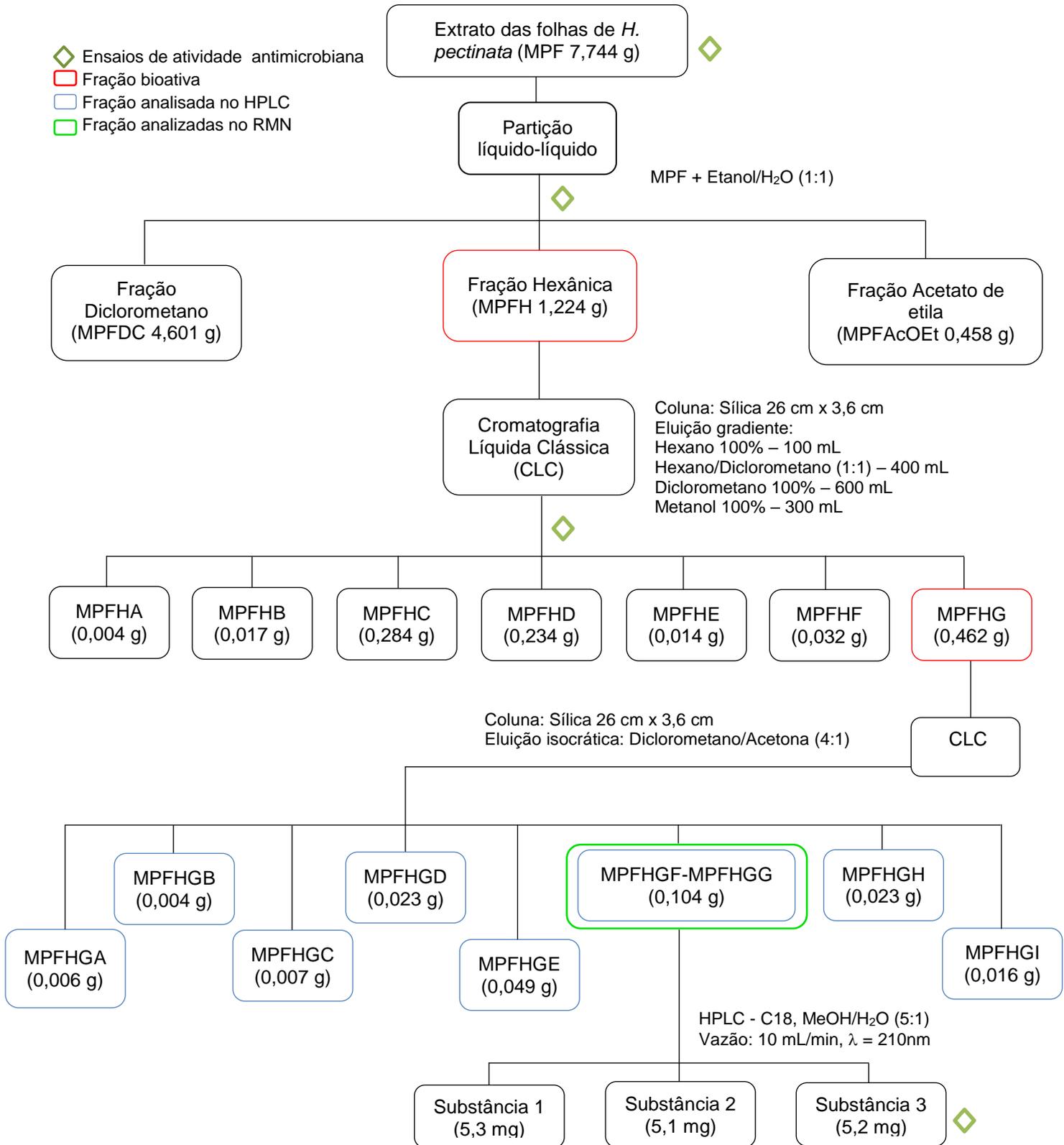
Os fracionamentos dos metabólitos secundários foram realizados por Cromatografia Líquida Clássica (CLC) utilizando-se colunas de vidro abertas empacotadas com sílica gel 60 (70-230 mesh), com 26 cm de comprimento e 3,6 cm de diâmetro interno.

As amostras foram preparadas pesando-se o extrato, que após ser dissolvido em diclorometano foi misturada a sílica para obtenção de uma mistura em forma de pó fino. A amostra adsorvida na sílica foi colocada no topo da coluna e, em seguida acrescentada a fase móvel. Após a eluição da fase móvel (modo gradiente), as subfrações coletadas foram submetidas à cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) para analisar o perfil de separação das substâncias. Em seguida as frações com perfil químico semelhante, foram reunidas.

Para as análises das amostras utilizou-se HPLC (Shimadzu), equipado com duas bombas LC-6AD, desgaseificador DGU-20A3R, detector UV-Vis SPD-20A, controladora CBM-20A. As condições cromatográficas foram: fase móvel metanol/água (MeOH/H<sub>2</sub>O; 90:10, 85:15 e 80:20), coluna C18 Waters (4,6 x 200 mm, 10 μ), vazão 1mL/min, volume de injeção de 10 μl e comprimento de onda de 210 nm.

Para o isolamento e purificação utilizou-se o mesmo equipamento mencionado acima, utilizando sistema semi-preparativo. A coluna utilizada foi uma C18 Waters (21,2 x 250 mm, 10 μ), fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O (85:15), vazão 10 mL/min, volume de injeção 500 μL e comprimento de onda 210 nm. Todas as condições desse fracionamento podem ser observadas no fluxograma da Figura 4.

#### 4.5 Resumo do fracionamento cromatográfico da *M. Pectinatum*



**Figura 4:** Fluxograma do fracionamento bioquímico do extrato das folhas de *M. pectinatum*.

#### **4.6 Identificação das substâncias isoladas por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear**

As análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram executadas em um espectrômetro BRUKER DRX (100 MHz para  $^{13}\text{C}$  e 400 MHz para  $^1\text{H}$ ), pertencentes ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Foram analisados os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a obtenção dos espectros necessários para o processo de elucidação estrutural das substâncias.

#### **4.7 Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar**

Os extratos, frações e compostos obtidos foram avaliados utilizando o método de difusão em ágar descrito por Kirby-Bauer em 1966. Para a realização do método, um inóculo padronizado da bactéria preparado em meio BHI (brain heart infusion) estéril, na escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) é semeado sobre a superfície do Ágar Muller-Hington de forma uniforme, em seguida discos de papel de filtro ( $d = 6,19$  mm) são impregnados com as amostras dos extratos e frações obtidas, em diferentes concentrações (7,5; 15; 30 e 60  $\mu\text{g}/\text{disco}$ ) e distribuídos sobre o ágar. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico cefadroxil (30 $\mu\text{g}/\text{disco}$ ).

As placas devidamente preparadas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C. Após o tempo de incubação, procedeu-se a leitura dos halos de inibição (zona clara onde não houve o crescimento bacteriano), considerando ativos os halos de inibição maiores de 6,19 mm (OPLUSTIL et al., 2004). Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição em mm e calculado o desvio padrão.

Durante os ensaios foram utilizadas cepas padrão (ATCC): *S. aureus* (ATCC 25923) e *S. aureus* MRSA (PNCQ 357) – cepa hospitalar.

#### **4.8 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica da microdiluição em caldo**

A determinação da CIM das substâncias ativas foi realizada segundo a metodologia da diluição em caldo (microtécnica) proposta pelo NCCLS em 2003, com as mesmas bactérias utilizadas nas técnicas de difusão em ágar. Foram utilizadas microplacas com fundo chato esterilizadas com 96 poços. Cada poço recebeu o inóculo ( $6 \times 10^6$  UFC/mL), o meio de cultura líquido BHI e as soluções das substâncias dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) com concentrações finais que variaram de 25 a 200  $\mu\text{g/mL}$ , sendo o volume final de 100  $\mu\text{L}$ . Foi utilizada como controle negativo a solução de DMSO acrescido da suspensão bacteriana. Logo após a micropipetagem, as placas foram tampadas e incubadas a 35 °C por 24 h, sem agitação. Terminado o período de incubação, a leitura foi realizada no leitor de ELISA. Dessa maneira foi possível determinar a menor concentração de cada substância capaz de inibir o crescimento dos microrganismos.

#### **4.9 Análise Estatística**

Os resultados obtidos no presente trabalho foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e avaliados estatisticamente usando-se a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey ou Dunnet, com auxílio do software GraphPad Prisma versão 5.0, sendo que as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

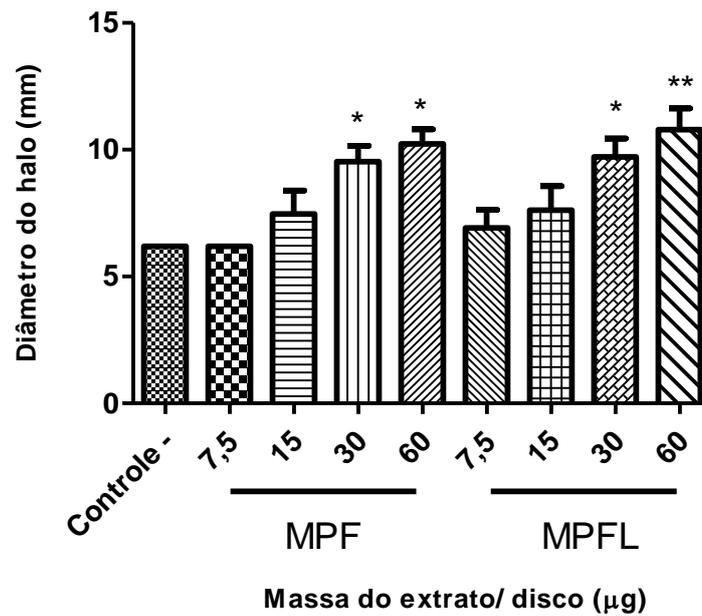
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as extrações realizadas por turbólise com os extratos das folhas e das flores da *M. pectinatum*, os extratos obtidos foram submetidos aos ensaios de atividade antimicrobiana frente a cepas de *S. aureus* e *S. aureus* resistente a meticilina.

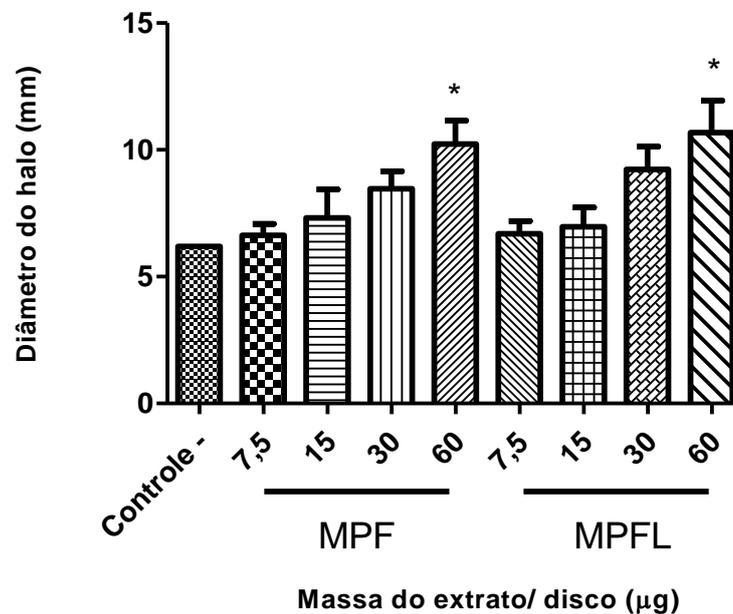
Por meio do teste de difusão em ágar com discos impregnados com as amostras foi possível verificar, de forma qualitativa, a atividade antimicrobiana da *M. pectinatum*. O controle negativo utilizado foi o disco sem amostra, enquanto que o controle positivo foi o cefadroxil (30 µg/disco), um antibacteriano de alto poder de ação frente às linhagens testadas.

### 5.1 Ensaios antimicrobianos com os extratos brutos das folhas e flores da *M. pectinata* (MPF e MPFL)

Os extratos demonstraram ser ativos frente às cepas testadas após o período de incubação de 18 horas. Observou-se que ambos os extratos (MPF e MPFL) inibiram o crescimento bacteriano, e que não há diferença estatística significativa entre as concentrações ativas (30 e 60 µg/disco), como pode ser observado nos Gráficos 1 e 2. A maior disponibilidade das folhas de *M. pectinatum* quando comparado com as flores, levou-nos a selecionar esta parte da planta para a realização dos estudos posteriores.



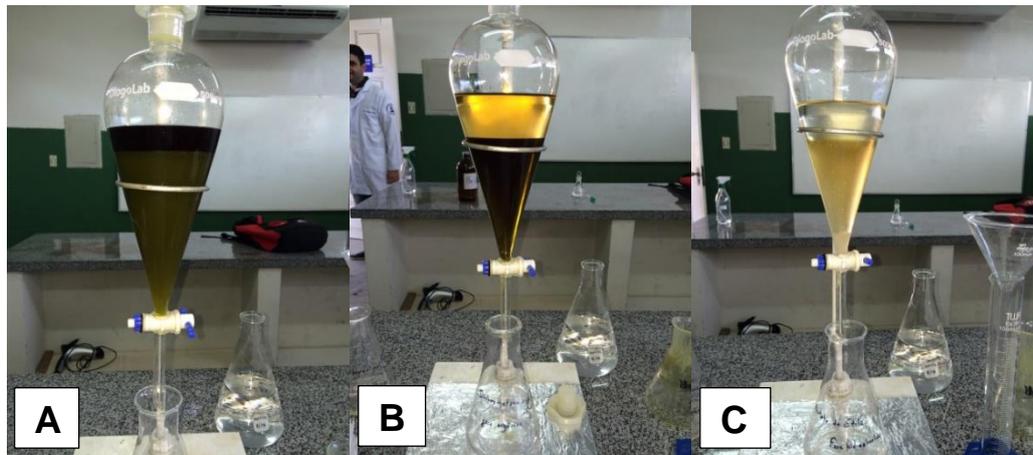
**Gráfico 1:** Efeito dos extratos obtidos por turboextração das folhas e das flores da *M. pectinatum*, frente à cepa de *S. aureus*. Os discos utilizados apresentam diâmetro de 6,19 mm. Cada coluna representa a média dos experimentos realizados em triplicata. \* $p < 0,05$  ou \*\* $p < 0,001$  vs controle (ANOVA seguido do teste de Dunnett).



**Gráfico 2:** Efeito dos extratos obtidos por turboextração das folhas e das flores da *M. pectinatum*, frente à cepa de *S. aureus* resistente a meticilina. Os discos utilizados apresentam diâmetro de 6,19 mm. Cada coluna representa a média dos experimentos realizados em triplicata. \* $p < 0,05$  ou \*\* $p < 0,001$  vs controle (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

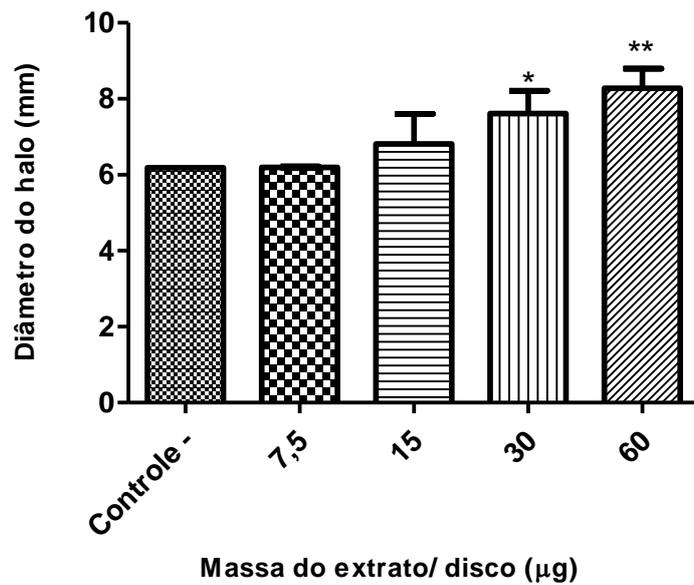
## 5.2 Ensaios antimicrobianos realizados com as frações obtidas após partição líquido-líquido do extrato das folhas da *M. pectinatum*

Na Figura 7 pode-se observar o processo de partição líquido-líquido. Partindo-se de 7,744 g do extrato seco das folhas da *M. pectinatum* (MPF) foi obtido: 1,224 g da fração hexânica (MPFH), 4,601 g da fração diclorometano (MPFDCM) e 0,458 g da fração acetato de etila (MPFACeOt).

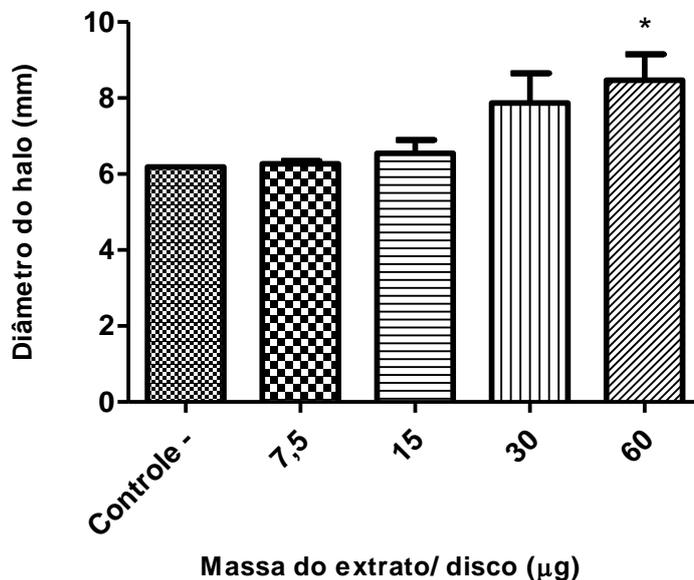


**Figura 5:** Imagens ilustrativas do processo de partição líquido-líquido da MPF com *n*-hexano (A), diclorometano (B) e acetato de etila (C). (Fonte: Autoria própria)

Após a realização dos ensaios antimicrobianos com as três frações obtidas da partição líquido-líquido a partir da MPF, observou-se que apenas a fração *n*-hexano (MPFH) demonstrou ser ativa contra as cepas de *S. aureus* testadas. Os Gráficos 3 e 4 correspondem aos resultados obtidos dos ensaios com a fração MPFH, onde pode ser observado através dos diâmetros dos halos, uma significativa inibição do crescimento antimicrobiano. Os diâmetros dos halos foram de 7,61 mm (30 µg/disco) e 8,37 mm (60 µg/disco) frente à cepa de *S. aureus* e 7,87 mm (30 µg/disco) e 8,47 mm (60 µg/disco) frente à cepa de *S. aureus* resistente a metilina.



**Gráfico 3:** Efeito da fração hexânica (MPFH) obtida por Partição liquido-liquido da *M. pectinatum* frente à cepa de *S. aureus*. Os discos utilizados apresentam diâmetro de 6,19 mm. Cada coluna representa a média dos experimentos realizados em triplicata. \* $p < 0,05$  ou \*\* $p < 0,001$  vs controle (ANOVA seguido do teste de Dunnet).



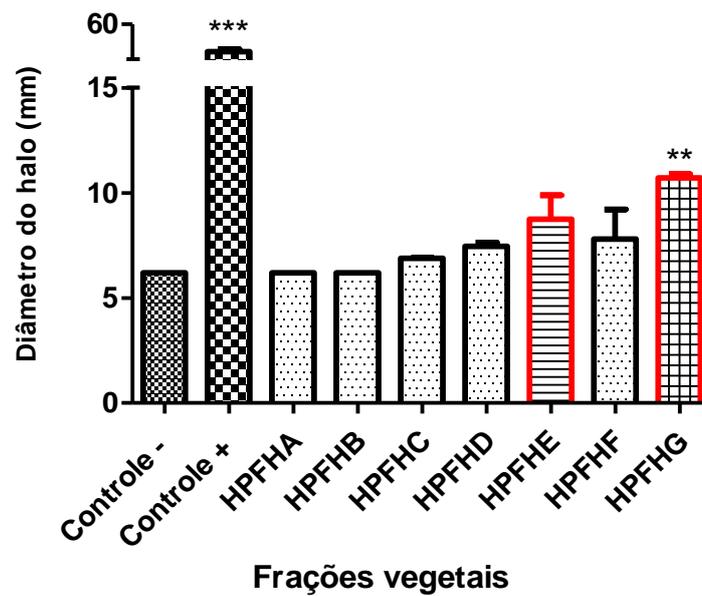
**Gráfico 4:** Efeito da fração hexânica (MPFH) obtida por Partição liquido-liquido da *M. pectinatum* frente à cepa de *S. aureus* resistente a meticilina. Os discos utilizados apresentam diâmetro de 6,19 mm. Cada coluna representa a média dos experimentos realizados em triplicata. \* $p < 0,05$  ou \*\* $p < 0,001$  vs controle (ANOVA seguido do teste de Dunnet).

No entanto, considerando que a fração MPFH apresentou inibição do crescimento antimicrobiano, deu-se continuidade à busca de substâncias bioativas com esta fração. Em seguida, separações cromatográficas foram realizadas a fim de se isolar as substâncias bioativas presentes nela.

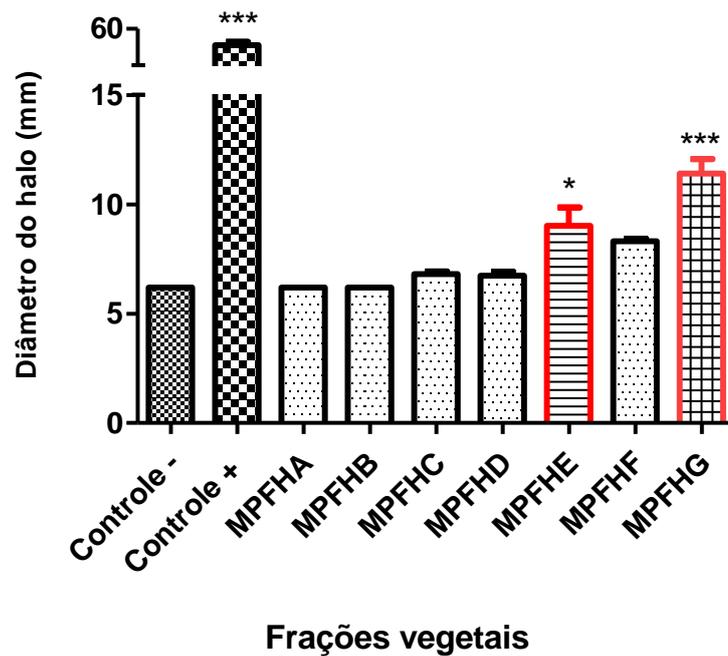
### **5.3 Fracionamento da fração MPFH e ensaios de atividade antimicrobiana das subfrações obtidas**

A cromatografia líquida clássica (CLC), foi realizada utilizando uma coluna de 26 cm de altura por 3,6 cm de diâmetro empacotada com sílica. A eluição foi feita no modo gradiente utilizando como solventes: *n*-hexano 100%, *n*-hexano/diclorometano (1:1), diclorometano 100% e metanol 100%. As frações obtidas por CLC a partir da fração MPFH, foram submetidas à cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) para analisar o perfil de separação das substâncias. Posteriormente, foram realizadas reuniões das subfrações quimicamente semelhantes, resultando em 7 subfrações (MPFHA-MPFHG). Todas as amostras foram submetidas a ensaios antimicrobianos.

Dentre as subfrações obtidas, as subfrações MPFHE e MPFHG apresentaram valores significativos de inibição. A fração MPFHE, obtida com a eluição do diclorometano (DCM), apresentou diâmetro de halo de 9,01 mm, já a fração MPFHG eluída com metanol (MeOH) apresentou diâmetro de halo de 11,41 mm, ambos na mesma concentração (60 µg/disco). Estas frações foram as que se mostraram mais ativas frente às cepas testadas, apresentando diâmetros de halos superiores a 9 mm (Gráfico 5 e 6).

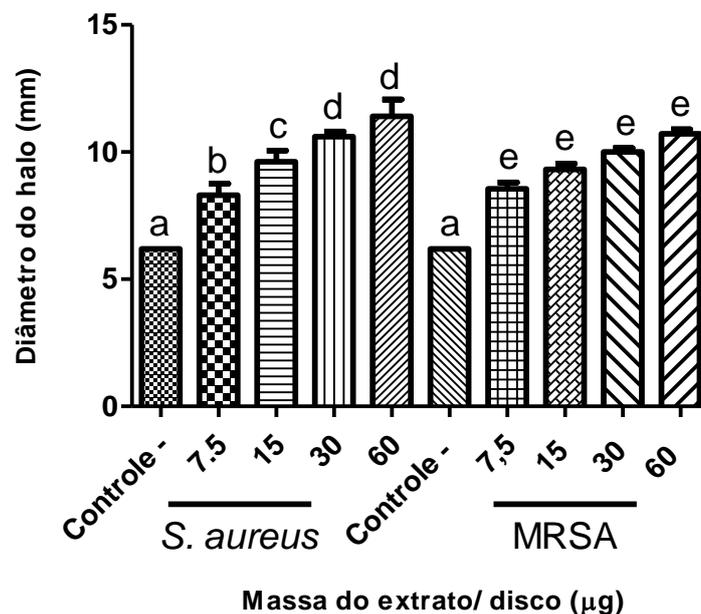


**Gráfico 5:** Efeito das subfrações (MPFHA-MPFHG) na concentração de 60 $\mu$ g/disco obtidas por CLC da *M. pectinatum* frente à cepa *S. aureus*. Os discos utilizados apresentam diâmetro de 6,19 mm. Cada coluna representa a média dos experimentos realizados em triplicata. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$  ou \*\*\* $p < 0,0001$  vs controle (ANOVA seguido do teste de Dunnet).



**Gráfico 6:** Efeito das subfrações (MPFHA-MPFHG) na concentração de 60 $\mu$ g/disco obtidas por CLC da *M. pectinatum* frente à cepa *S. aureus* resistente a metilicina. Os discos utilizados apresentam diâmetro de 6,19 mm. Cada coluna representa a média dos experimentos realizados em triplicata. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$  ou \*\*\* $p < 0,0001$  vs controle (ANOVA seguido do teste de Dunnet).

Após as análises estatísticas pode-se verificar, nos ensaios frente a cepa *S. aureus*, que a subfração MPFHG apresentou efeito concentração-dependente, ou seja, quanto maior a concentração da amostra, maior foi o halo de inibição microbiana. Frente a cepa de *S. aureus* resistente a meticilina, a subfração MPFHG não apresentou efeito concentração-dependente, com diâmetros de halos entre 8 mm e 10 mm nas concentrações testadas, como pode ser observado no Gráfico 7.



**Gráfico 7:** Efeito da subfração MPFHG frente às cepas *S. aureus* e *S. aureus* resistente a meticilina. Os discos utilizados apresentam diâmetro de 6,19 mm. Cada coluna representa a média dos experimentos realizados em triplicata. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$  ou \*\*\* $p < 0,0001$  vs controle (ANOVA seguido do teste de Tukey). Letras diferentes indicam que há diferença estatística significativa.

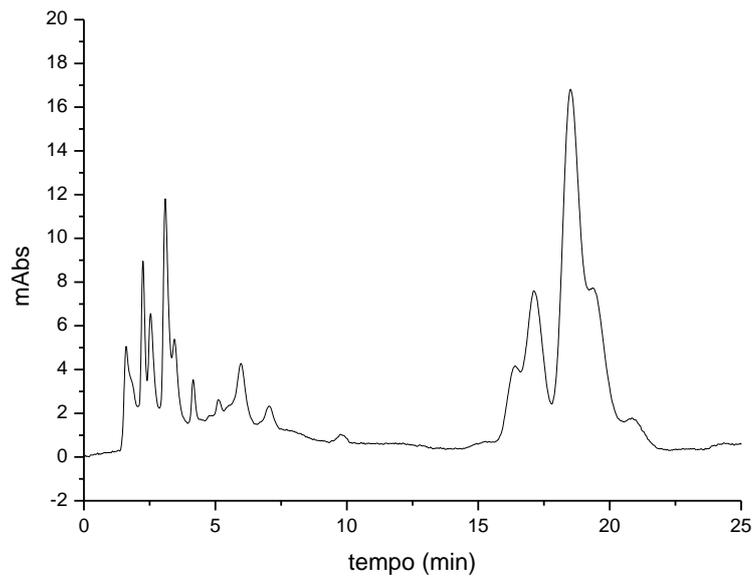
Mesmo com os halos mais expressivos, chegando até a 11,41 mm na concentração de 60 µg/disco, frente a cepa de *S. aureus*, deu-se continuidade nos ensaios com a cepa de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) levando-se em consideração que a ocorrência e proliferação de cepas de *S. aureus* MRSA são causa de muita preocupação não somente no meio hospitalar, mas também na comunidade, desde que poucos agentes podem tratar infecções por estes microorganismos. Virtualmente as cepas de MRSA estão resistentes a todos os  $\beta$ -

lactâmico, macrolídeos, tetraciclina, aminoglicosídeos, sendo vancomicina e teicoplanina, os dois glicopeptídeos usados na clínica para o tratamento destas infecções por *S. aureus* MRSA (Shibata 2005).

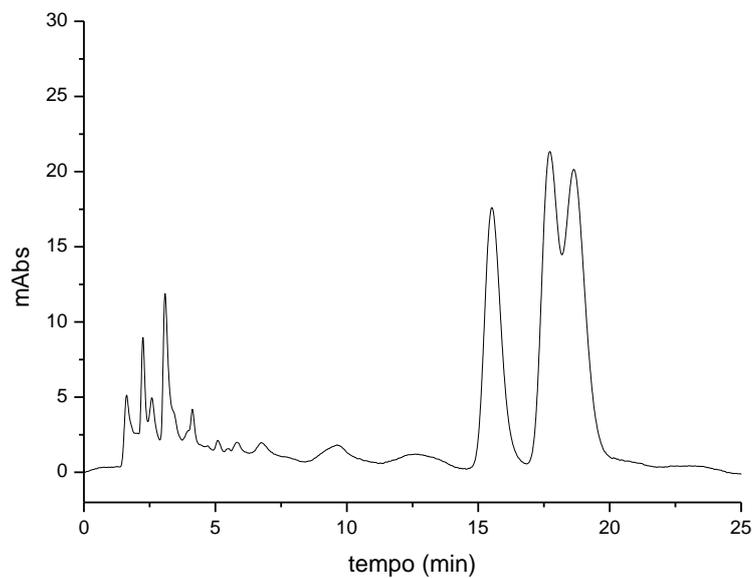
#### **5.4 Fracionamento da subfração MPFHG e análise do perfil cromatográfico das subfrações obtidas de MPFHG utilizando HPLC**

Com a subfração ativa, MPFHG, foi realizada uma CLC com uma coluna cromatográfica de 26 cm de altura por 3,6 cm de diâmetro empacotada com sílica. A eluição foi feita no modo isocrático utilizando como solventes: diclorometano/acetona (4:1), com o objetivo de isolar a/as substâncias bioativas. Foram obtidas 102 subfrações, onde após a análise em CCDA as frações quimicamente semelhantes foram reunidas resultando em 9 subfrações (MPFHGA-MPFHGI).

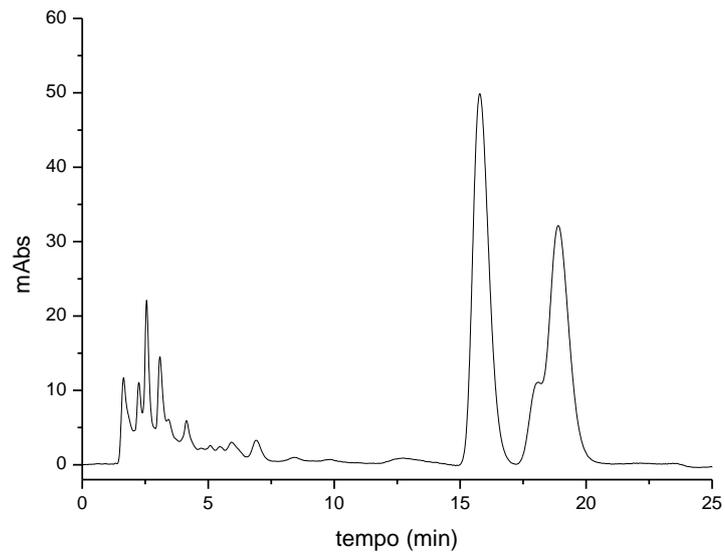
Foram previamente realizadas injeções no HPLC, em escala analítica, das subfrações obtidas que apresentaram as maiores massas. Com o objetivo de obter o perfil cromatográfico de cada amostra, Foi utilizada uma coluna C18 (4,6 x 200 mm, 10  $\mu$ m) Waters Spherisorb a 25°C utilizando como fase móvel Metanol/H<sub>2</sub>O (85:15), a 210 nm e vazão de 1,0 mL/min, com volume de injeção de 20  $\mu$ L (Gráficos 8-12).



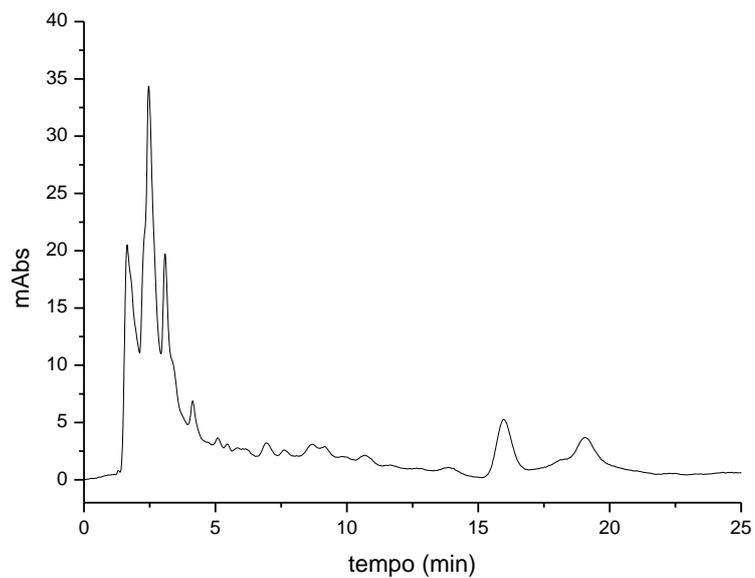
**Gráfico 8:** Cromatograma da fração MPFHGE obtida a partir de HPLC em escala analítica. Foi utilizada uma coluna C18 (4,6 x 200 mm, 10  $\mu$ ) Waters Spherisorb a 25°C utilizando MeOH /H<sub>2</sub>O (85:15), a 210 nm e vazão de 1,0 mL/min. Volume da injeção 20  $\mu$ L.



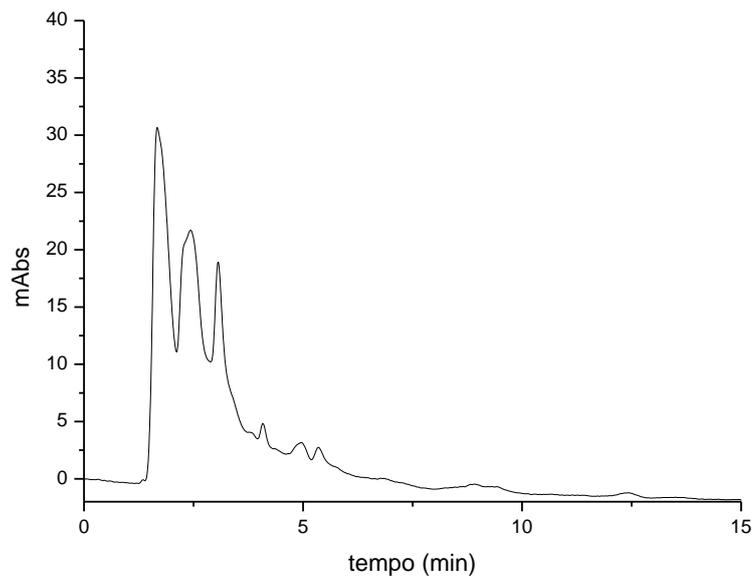
**Gráfico 9:** Cromatograma da fração MPFHGF obtida a partir de HPLC em escala analítica. Foi utilizada uma coluna C18 (4,6 x 200mm, 10 $\mu$ ) Waters Spherisorb a 25°C utilizando MeOH /H<sub>2</sub>O (85:15), a 210 nm e vazão de 1,0 mL/min. Volume da injeção 20  $\mu$ L.



**Gráfico 10:** Cromatograma da fração MPFHGG obtida a partir de HPLC em escala analítica. Foi utilizada uma coluna C18 (4,6 x 200 mm, 10  $\mu$ ) Waters Spherisorb a 25°C utilizando MeOH /H<sub>2</sub>O (85:15), a 210 nm e vazão de 1,0 mL/min. Volume da injeção 20  $\mu$ L.



**Gráfico 11:** Cromatograma da fração MPFHGH obtida a partir de HPLC em escala analítica. Foi utilizada uma coluna C18 (4,6 x 200mm, 10 $\mu$ ) Waters Spherisorb a 25°C utilizando MeOH /H<sub>2</sub>O (85:15), a 210 nm e vazão de 1,0 mL/min. Volume da injeção 20  $\mu$ L.

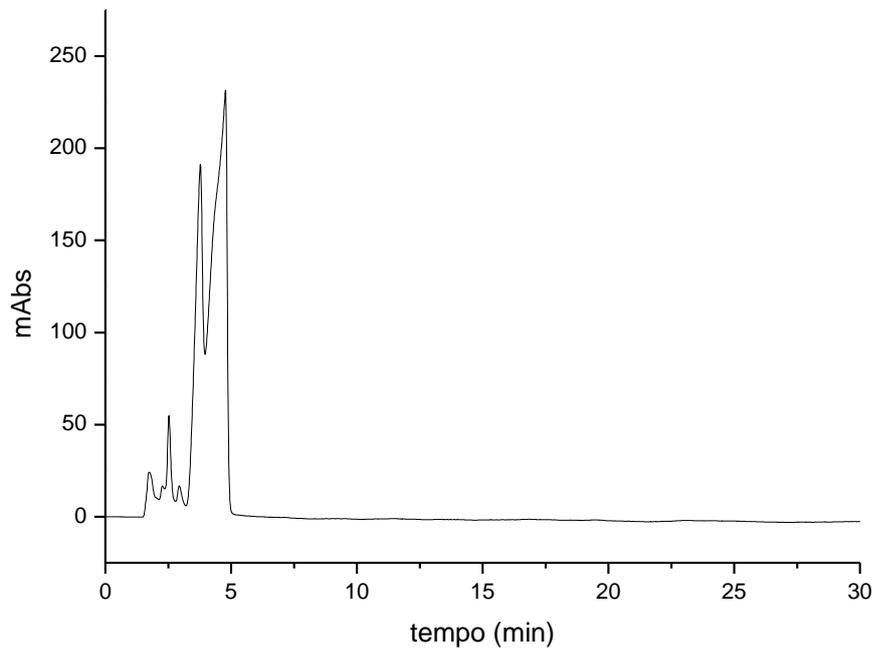


**Gráfico 12:** Cromatograma da fração MPFHGI obtida a partir de HPLC em escala analítica. Foi utilizada uma coluna C18 (4,6 x 200 mm, 10  $\mu$ ) Waters Spherisorb a 25°C utilizando MeOH /H<sub>2</sub>O (85:15), a 210 nm e vazão de 1,0 mL/min. Volume da injeção 20  $\mu$ L.

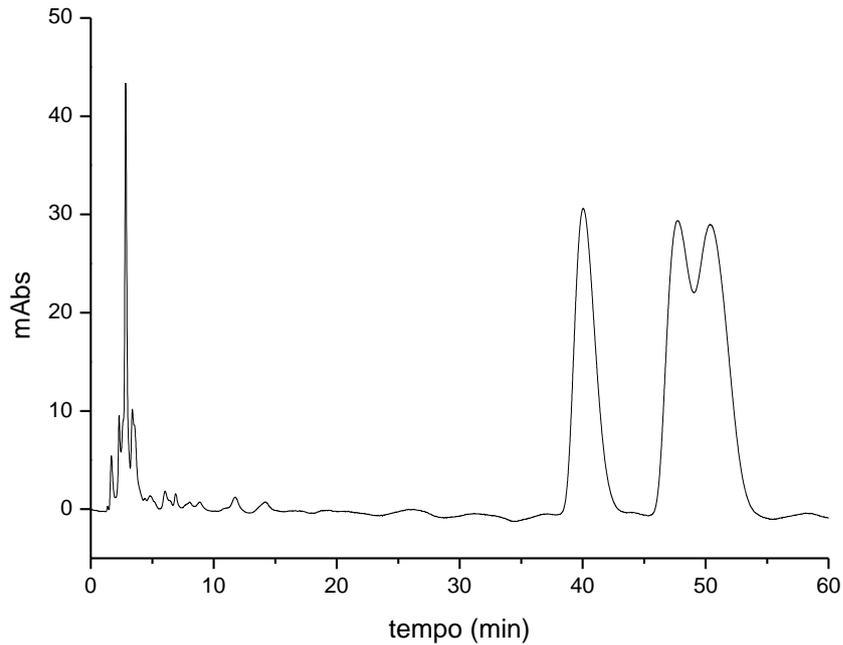
Foi possível verificar que as subfrações MPFHGE a MPFHGG apresentaram um melhor perfil de separação dos picos, que eluíram entre os tempos de retenção de 15 a 20 minutos. Já as subfrações MPFHGH e MPFHGI não apresentaram boa separação das bandas cromatográficas, que se concentraram entre os tempos de retenção de 0 a 5 minutos.

As subfrações MPFHGF e MPFHGG por apresentarem uma semelhança nos seus perfis, foram reunidas, para o isolamento de quantidades significativas de cada substância. O isolamento das substâncias foi realizado utilizando o HPLC no modo semi-preparativo, após a seleção da melhor fase móvel para a separação das substâncias presentes nestas frações. Foram testadas as seguintes fases móveis: MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10, 80:20 e 85:15), utilizando coluna C18 waters (4,6 x 200 mm, 5  $\mu$ m), vazão de 1 mL/min, comprimento de onda de 210 nm e volume de injeção de 20  $\mu$ L.

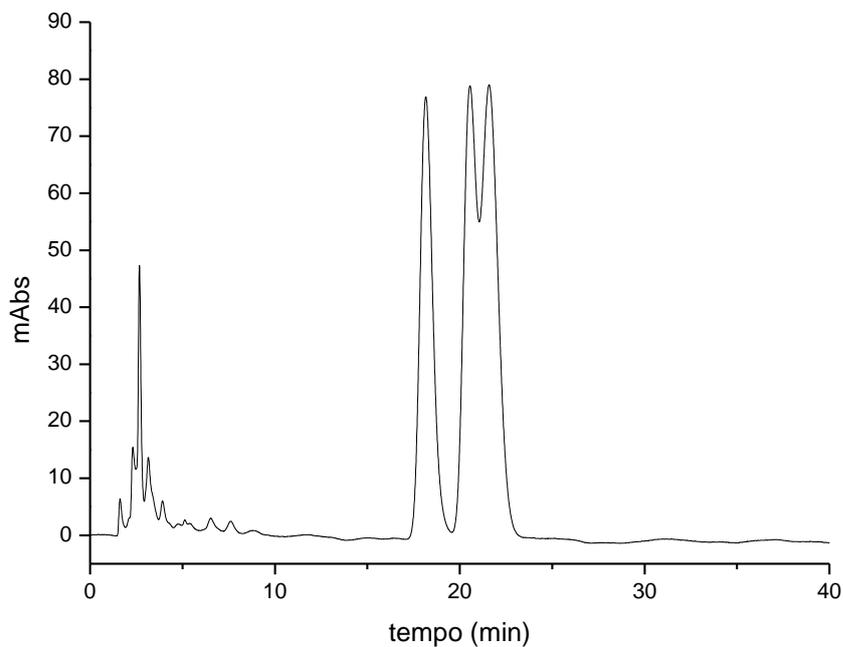
Os Gráficos 13, 14 e 15 correspondem aos cromatogramas da fração obtida após reunião das frações MPFHGF e MPFHGG (MPFHGF-G) utilizando HPLC em escala analítica. A fração foi injetada numa coluna C18 Waters (4,6 x 200 mm, 10  $\mu$ m), vazão de 1 mL/min, comprimento de onda de 210 nm e volume de injeção de 20  $\mu$ L.



**Gráfico 13:** Cromatograma da fração HPFHGF-G obtido em HPLC em semi-preparativo. Coluna C18 Waters (4,6 x 200 mm, 10 $\mu$ ), fase móvel MeOH /H<sub>2</sub>O (90:10), vazão de 10 mL/min e comprimento de onda de 210 nm. Volume da injeção: 20  $\mu$ L.



**Gráfico 14:** Cromatograma da fração HPFHGF-G obtido em HPLC em semi-preparativo. Coluna C18 Waters (4,6 x 200 mm, 10  $\mu$ ), fase móvel MeOH /H<sub>2</sub>O (80:20), vazão de 10 mL/min e comprimento de onda de 210 nm. Volume da injeção: 20  $\mu$ L.



**Gráfico 15:** Cromatograma da fração HPFHGF-G obtido em HPLC em semi-preparativo. Coluna C18 Waters (4,6 x 200 mm, 10  $\mu$ ), fase móvel MeOH /H<sub>2</sub>O (85:15), vazão de 10 mL/min e comprimento de onda de 210nm. Volume da injeção: 20  $\mu$ L.

Com essas condições cromatográficas conseguiu-se analisar o perfil de separação das bandas cromatográficas quando submetidas a diferentes proporções da mistura binária utilizada. Como pode ser observado na Figura 13, as substâncias presentes na amostra injetada coeluíram. A consequência desse tipo de coeluição é uma inadequada coleta do composto de interesse. Dessa forma, na tentativa de se obter uma melhor resolução pode-se alterar a proporção do solvente de maneira a garantir: (a) uma maior retenção dos compostos (aumento do fator de retenção); (b) uma maior seletividade (aumento do fator de separação), ou ambos; além da possibilidade de aumentar a eficiência cromatográfica.

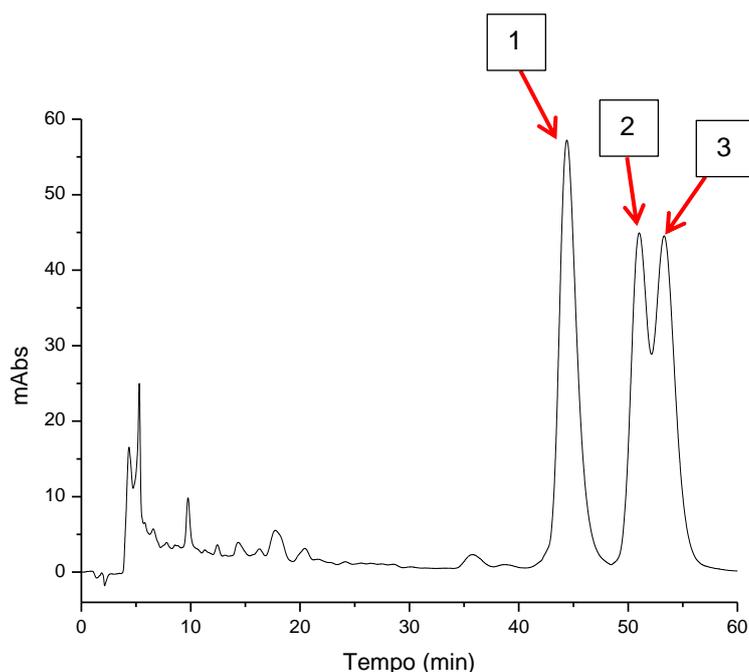
O Gráfico 14 está representado o cromatograma de uma nova injeção da amostra com uma proporção de solvente correspondente a MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20). Observa-se que a diminuição da proporção do MeOH levou a bandas com tempos de retenção muito altos e com aspectos alargados. Na tentativa de se obter uma melhor eficiência e a seletividade dos compostos eluídos, uma nova injeção foi feita com MeOH/H<sub>2</sub>O (85:15). No Gráfico 15 já pode ser observado que essa proporção de solvente utilizada se obteve uma separação com uma melhor resolução/separação das bandas, o que permitiu o isolamento de três substâncias.

Após estudo cromatográfico das fases moveis, com o objetivo de se melhorar a separação das substâncias presentes na fração **HPFHGF-G**, realizou-se o aumento de escala para o isolamento dessas substâncias (1, 2 e 3), como pode ser observado no Gráfico 16. O escalonamento das condições analíticas foi realizado utilizando a equação abaixo:

$$S: \frac{R_P^2 \cdot L_P}{R_A^2 \cdot L_A}$$

Onde R<sub>p</sub> e R<sub>A</sub> são os raios da coluna preparativa e analítica, respectivamente, e L<sub>p</sub> e L<sub>A</sub>, são os comprimentos das colunas preparativa e analítica, respectivamente (CASS e DEGANI, 2001).

A vazão do solvente não pode ser escalonada, uma vez que se fosse utilizada a vazão calculada levando-se em conta o fator de escalonamento, a pressão do sistema se elevaria a um valor acima do permitido pelo equipamento.



**Gráfico 16:** Cromatograma da HPFHGF-G obtido em HPLC semi-preparativo. A fração foi injetada numa coluna C18 Waters (21,2 x 250 mm, 10  $\mu$ ), utilizando MeOH /H<sub>2</sub>O (85:15), vazão de 10 mL/min e comprimento de onda de 210 nm. Volume da injeção: 500  $\mu$ L.

### 5.5 Dados espectroscópicos das substâncias isoladas das folhas da *M. pectinatum*

A identificação das substâncias isoladas foi realizada através das análises dos dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C das substâncias e comparados com os dados da literatura (Tabela 3 e 4) (ALTINIER, 2007; MARTINS, 2003).

Ácido micromérico (1). Sólido branco. <sup>1</sup>H RMN (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 5,16 (1H, t,  $J$  = 3,5; CH-12), 5,57 (1H, s, CH<sub>a</sub>-30), 5,57 (1H, s, CH<sub>b</sub>-30) 3,10 (1H, dd,  $J$  = 11,0; 4,8 Hz, CH-3), 1,07 (3H, s, CH<sub>3</sub>-27), 0,90 (3H, d, CH<sub>3</sub>-29), 0,88 (3H, s, CH<sub>3</sub>-23), 0,86 (3H, s, CH<sub>3</sub>-25), 0,76 (3H, s, CH<sub>3</sub>-24), 0,68 (3H, s, CH<sub>3</sub>-26). <sup>13</sup>C RMN (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz):  $\delta$  (ppm) = 181,5 (C-28); 154,7 (C-20); 139,5 (C-13); 127,0 (C-12); 105,1 (C-30); 79,7 (C-3); 56,8 (C-5); 56,7 (C-18); 43,3 (C-9); 40,8 (C-17); 40,5 (C-14); 40,0 (C-8); 39,8 (C-22); 38,6 (C-1); 38,1 (C-4); 34,3 (C-19); 33,4 (C-10); 30,8 (C-7); 30,7 (C-21); 29,3 (C-23); 28,8 (C-15); 27,9 (C-2); 25,4 (C-16); 24,4 (C-11); 24,0 (C-27); 19,5 (C-6); 17,9 (C-26); 16,8 (C-29); 16,4 (C-24); 16,0 (C-25).

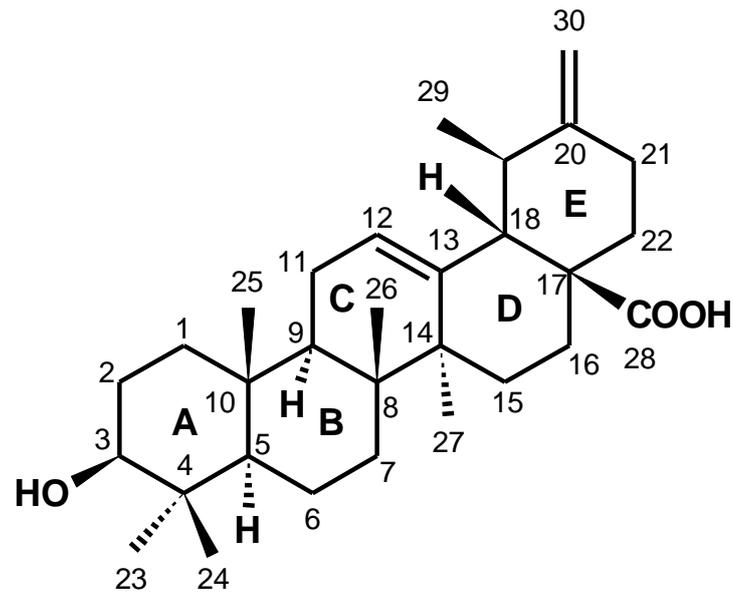


Figura 6: Estrutura química do ácido micromérico.

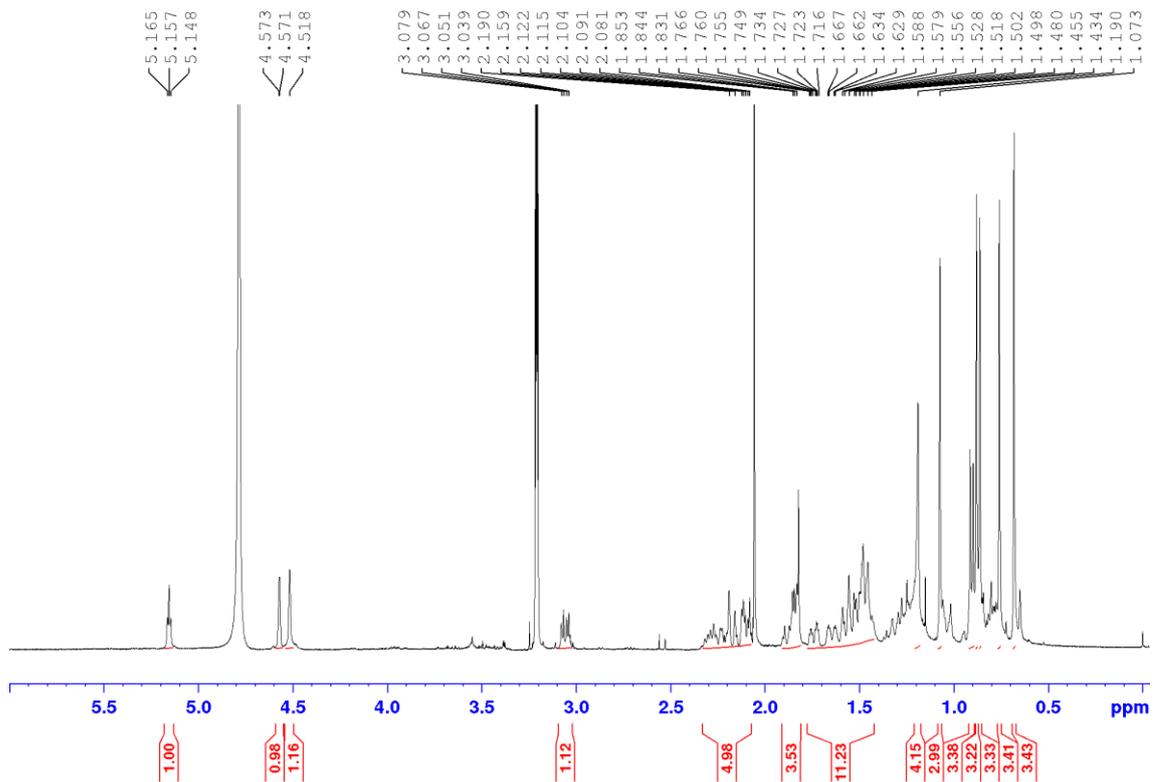


Figura 7: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) do ácido micromérico.

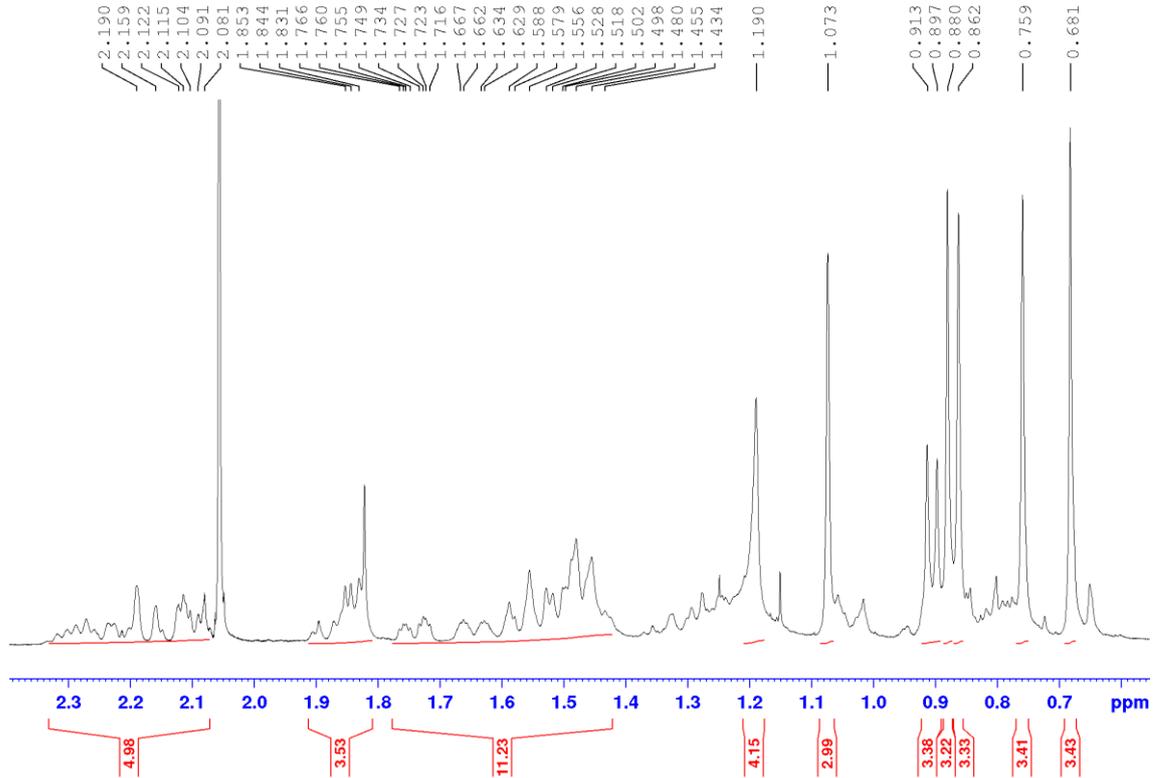


Figura 8: Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) do ácido micromérico.

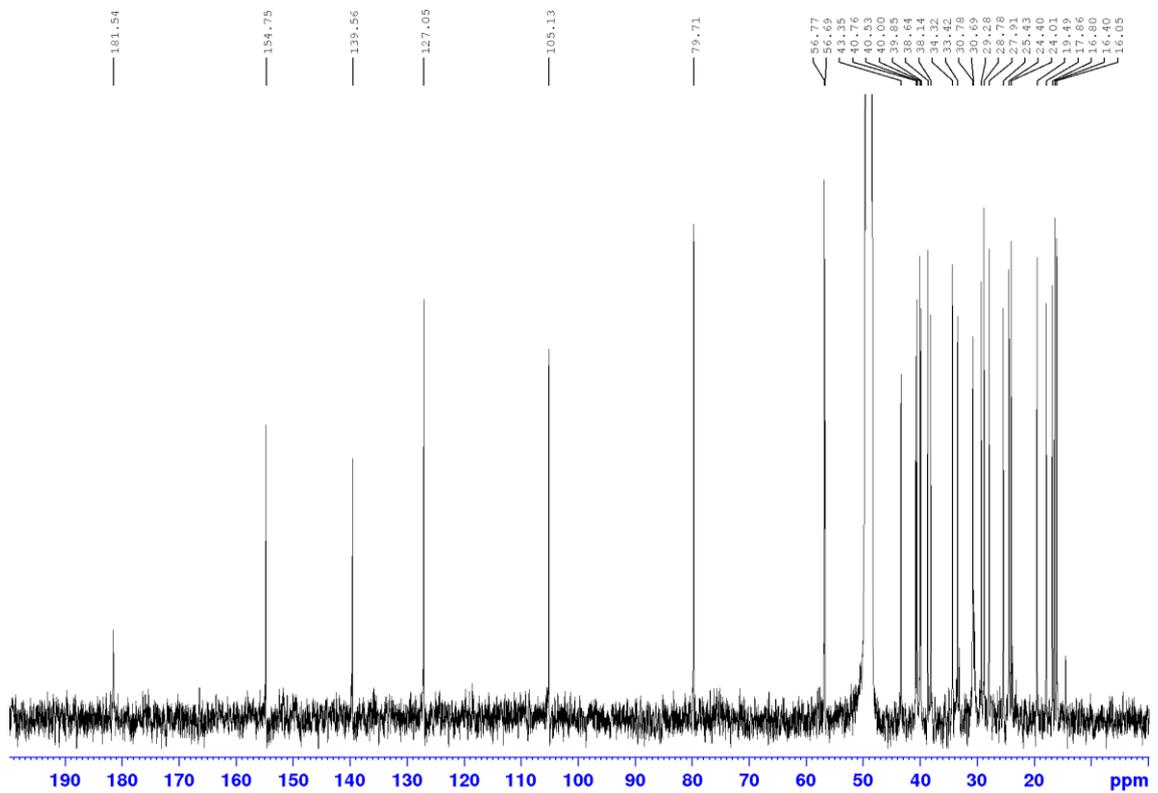


Figura 9: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz) do ácido micromérico.

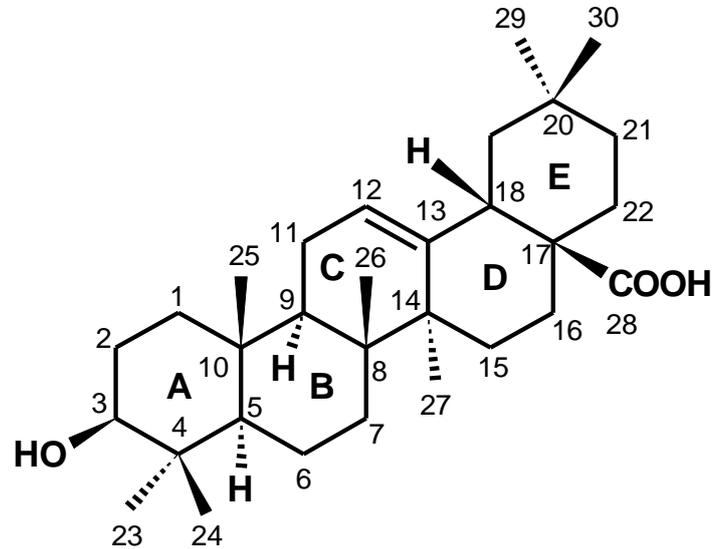
**Tabela 3:** Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o Ácido micromérico (1) e seu éster metílico ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) (ALTINIER, 2007).

position <sup>a</sup>	DEPT	micromeric acid		micromeric acid methyl ester	
		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( $J_{\text{HH}}$ in Hz) <sup>b</sup>	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( $J_{\text{HH}}$ in Hz) <sup>b</sup>
1	$\text{CH}_2$	39.9	1.66 m	39.7	1.65 m
2	$\text{CH}_2$	28.5	1.03 m	28.3	1.02 m
3	CH	80.3	3.25 dd (11.1, 4.0)	80.1	3.23, dd (11.0, 4.0)
4	C	39.9		39.5	
5	CH	56.7	0.74 m	55.9	0.73 m
6	$\text{CH}_2$	18.3	0.95 m	18.0	0.94 m
7	$\text{CH}_2$	34.2	1.52 m	34.0	1.53 m
8	C	40.7	1.36 m	40.2	1.32 m
9	CH	48.8	1.55 m	48.3	1.56 m
10	C	38.2		37.9	
11	$\text{CH}_2$	24.6	1.96	24.3	1.95
12	CH	127.7	5.34 t (3.5)	127.2	5.29 t (3.5)
13	C	138.0		137.9	
14	C	43.3		43.1	
15	$\text{CH}_2$	29.1	1.90, 1.19 m	28.9	1.89, 1.20 m
16	$\text{CH}_2$	25.6	1.79 ddd (13.0, 12.0, 5.1), 2.23 ddd (12.0, 5.0, 3.1)	25.4	1.78 ddd (13.0, 12.0, 5.1), 2.24 ddd (12.0, 5.0, 3.1)
17	C	48.0		48.1	
18	CH	56.1	2.31 br s	55.9	2.30 br s
19	CH	38.7	2.39 d (11.0, 6.2)	38.4	2.40 d (11.0, 6.2)
20	C	152.8		152.6	
21	$\text{CH}_2$	33.5	2.25, 2.31 m	33.0	2.26, 2.30 m
22	$\text{CH}_2$	40.1	1.92, 1.73 m	39.9	1.90, 1.74 m
23	$\text{CH}_3$	29.4	1.00 s	29.0	1.02 s
24	$\text{CH}_3$	16.9	0.79 s	17.0	0.80 s
25	$\text{CH}_3$	16.6	0.94 s	16.3	0.95 s
26	$\text{CH}_3$	18.3	0.78 s	18.0	0.76 s
27	$\text{CH}_3$	24.6	1.16 s	24.0	1.15 s
28	C	177.8		177.2	
29	$\text{CH}_3$	17.3	1.03 d (6.2)	17.1	1.00 d (6.2)
30	$\text{CH}_2$	106.5	4.65 br s	106.0	4.65 br s
-OMe	$\text{CH}_3$		4.70 br s	52.1	4.70 br s 3.49 s

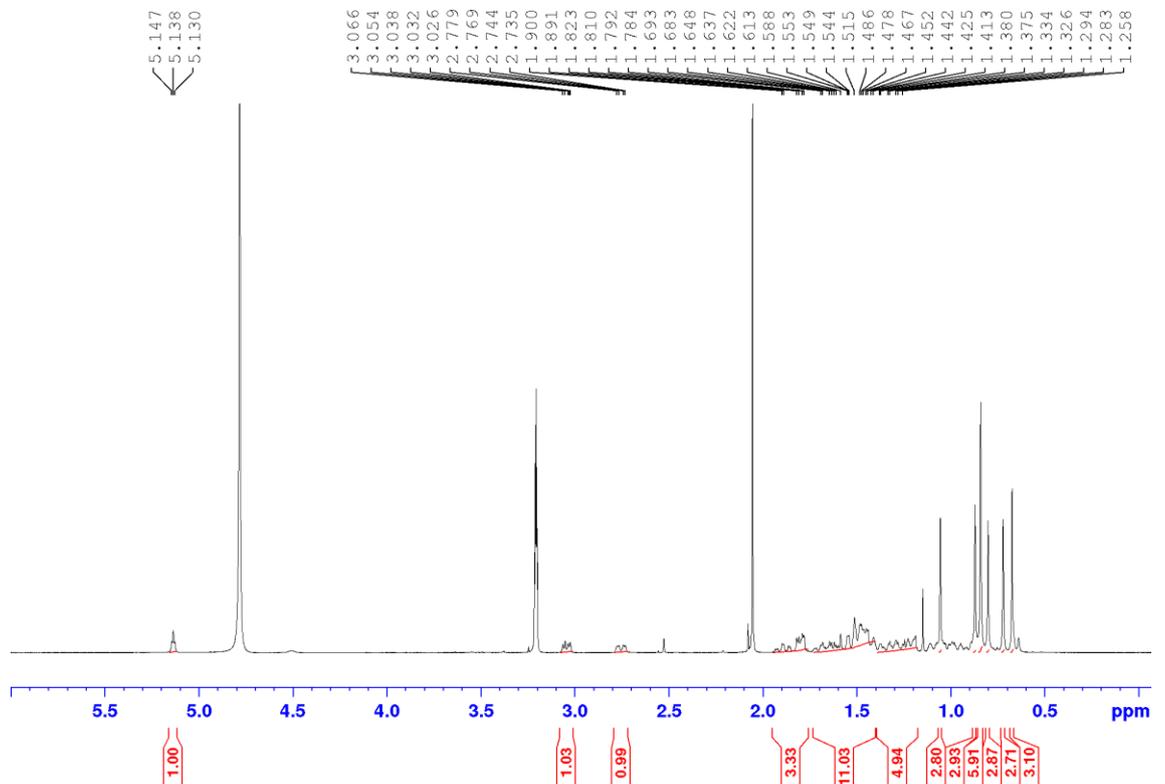
O ácido micromérico (ácido 3b-hidroxi-12,20(30)-dien-28-óico),  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$  (NCBI, 2018), foi isolado pela primeira vez nesta espécie. Esse triterpenóide possui propriedades biológicas anti-inflamatórias tóxicas e antinociceptiva – anulando ou reduzindo a percepção e transmissão de estímulos que causam dor e inflamação (ALTINIER et al., 2007; COSTA, 2003; MARTÍNEZ; 2012). É uma substância pouco explorada em outros gêneros e espécies de plantas já isoladas. Estes resultados estimulam a realização de ensaios mais aprofundados com essa substância, para se obter mais informações.

Ácido oleanólico (2). Sólido branco.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 5,14 (1H, t,  $J = 3,6$ , CH-12), 3,16 (1H, dd,  $J = 11,2$ ; 4,7 Hz, CH-3), 2,76 (1H, dd,  $J = 14,0$ ; 3,6 Hz, CH-18), 1,06 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -27), 0,87 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -23), 0,84 (6H, s,  $\text{CH}_3$ -25 e  $\text{CH}_3$ -29), 0,80 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -30), 0,72 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -26), 0,68 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -24).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz):  $\delta$  (ppm) = 182,5 (C-28); 145,4 (C-13); 123,5 (C-12); 79,7 (C-3); 56,8 (C-5); 47,8 (C-9); 47,4 (C-17); 42,9 (C-19); 42,83 (C-14); 40,6 (C-18); 39,8 (C-8); 38,2 (C-4); 35,0 (C-1); 34,0 (C-10); 33,9 (C-21); 33,6 (C-29); 31,6 (C-7);

30,7 (C-22); 29,5 (C-20); 28,9 (C-23); 28,7(C-15); 27,9 (C-2); 26,4 (C-27); 24,5 (C-11); 24,1(C-16); 24,0 (C-30); 19,5 (C-6); 17,8 (C-26); 16,3 (C-24); 15,9 (C-25).



**Figura 10:** Estrutura química do ácido oleanólico.



**Figura 11:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) do ácido oleanólico.

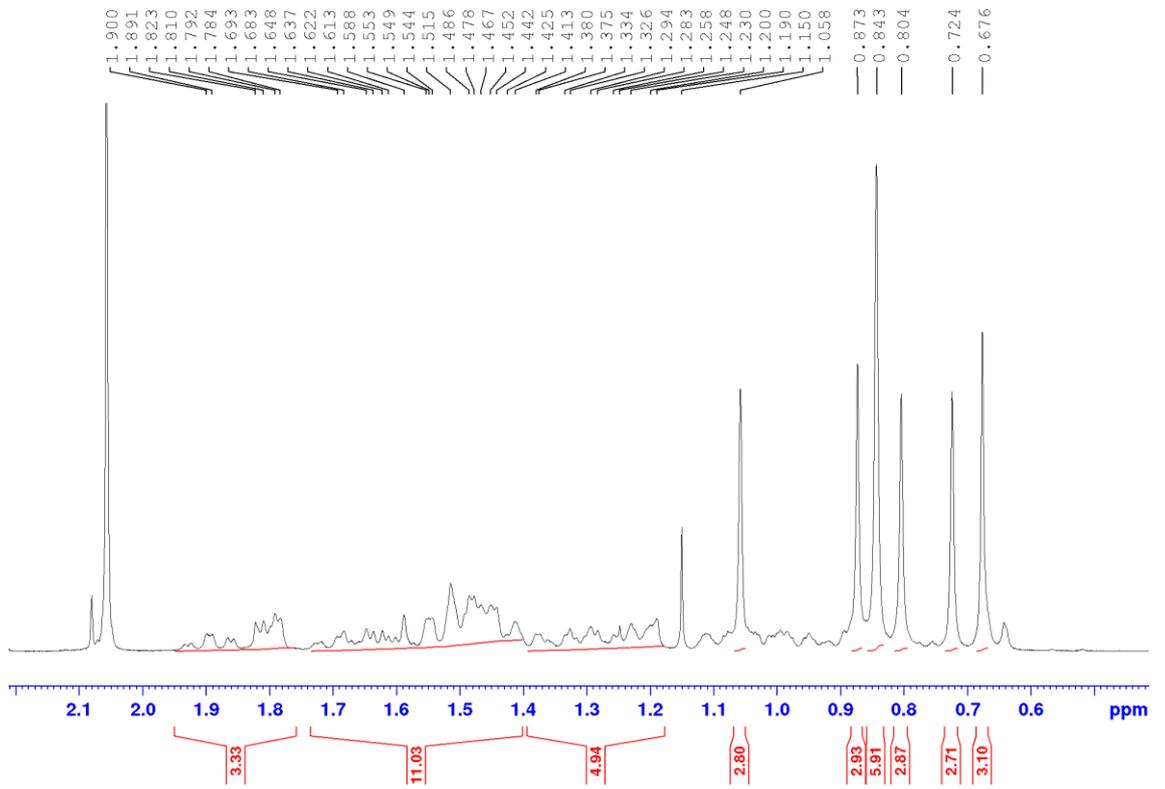


Figura 12: Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) do ácido oleanólico.

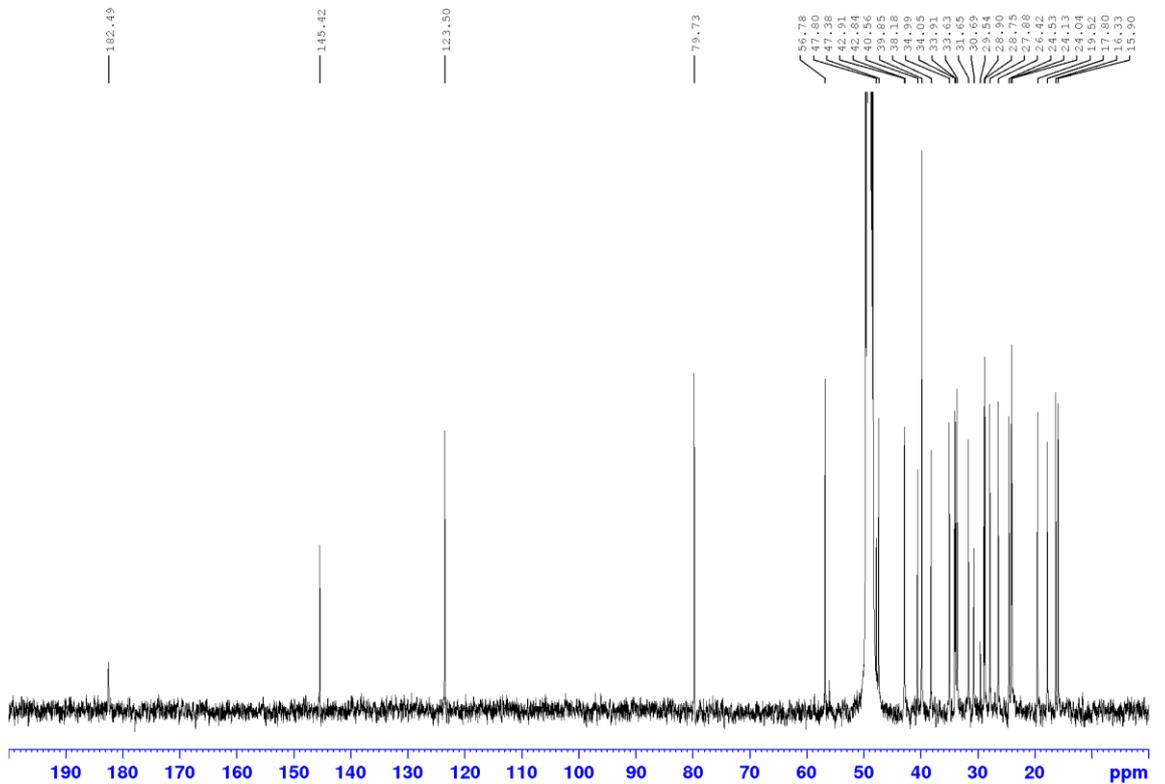
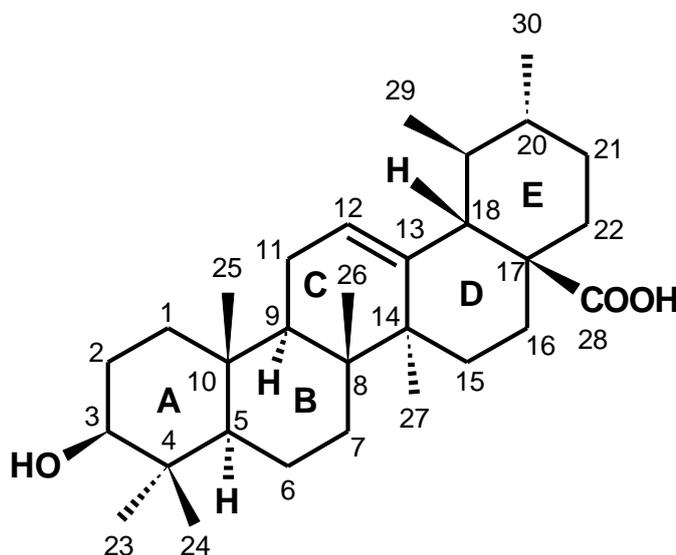


Figura 13: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz) do ácido oleanólico.

O ácido oleanólico (ácido 3 $\beta$ -hidroxioleano-12-em-28-óico), C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>, é um triterpeno de esqueleto carbônico do tipo oleanano, encontrado quase sempre com seu isômero, o ácido ursólico. Contudo, é observado que triterpenos de esqueleto oleanano apresentam atividade biológica menor que os triterpenos com esqueleto ursano e lupano (VECHIA, 2009). Alguns de seus derivados são mais ativos que o próprio ácido oleanólico, contudo, mesmo assim apresenta propriedades biológicas maiores que outros triterpenos como o lupeol (SPORN, 2000, VECHIA, 2009).

Ácido ursólico (3). Sólido branco. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz):  $\delta$  = 5,12 (1H, t, CH-12), 3,05 (1H, dd,  $J$  = 4,8; 11,2 Hz, CH-3), 2,11 (1H, dd,  $J$  = 11,2 Hz, CH-18), 1,01 (3H, s, CH<sub>3</sub>-27), 0,88 (3H, s, CH<sub>3</sub>-23), 0,87 (3H, d,  $J$  = 6,5 Hz, CH<sub>3</sub>-30), 0,86 (3H, s, CH<sub>3</sub>-25), 0,78 (3H, d,  $J$  = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>-29), 0,76 (3H, s, CH<sub>3</sub>-26), 0,68 (3H, s, CH<sub>3</sub>-24). <sup>13</sup>C RMN (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz):  $\delta$  (ppm) = 182,3 (C-28); 139,9 (C-13); 126,7 (C-12); 79,7 (C-3); 56,7 (C-5); 54,4 (C-18); 43,3 (C-9); 40,8 (C-17); 40,5 (C-14); 40,4 (C-8); 40,0 (C-4); 39,8 (C-19); 38,2 (C-20); 38,1 (C-1); 34,4 (C-10); 31,9 (C-22); 30,7 (C-7); 29,3 (C-21); 28,8 (C-15); 27,9 (C-23); 25,4 (C-2); 24,4 (C-16); 24,1 (C-27); 21,6 (C-11); 19,5 (C-30); 18,4 (C-6); 17,9 (C-26); 17,7 (C-29); 16,4 (C-24); 16,0 (C-25).



**Figura 14:** Estrutura química do ácido ursólico.

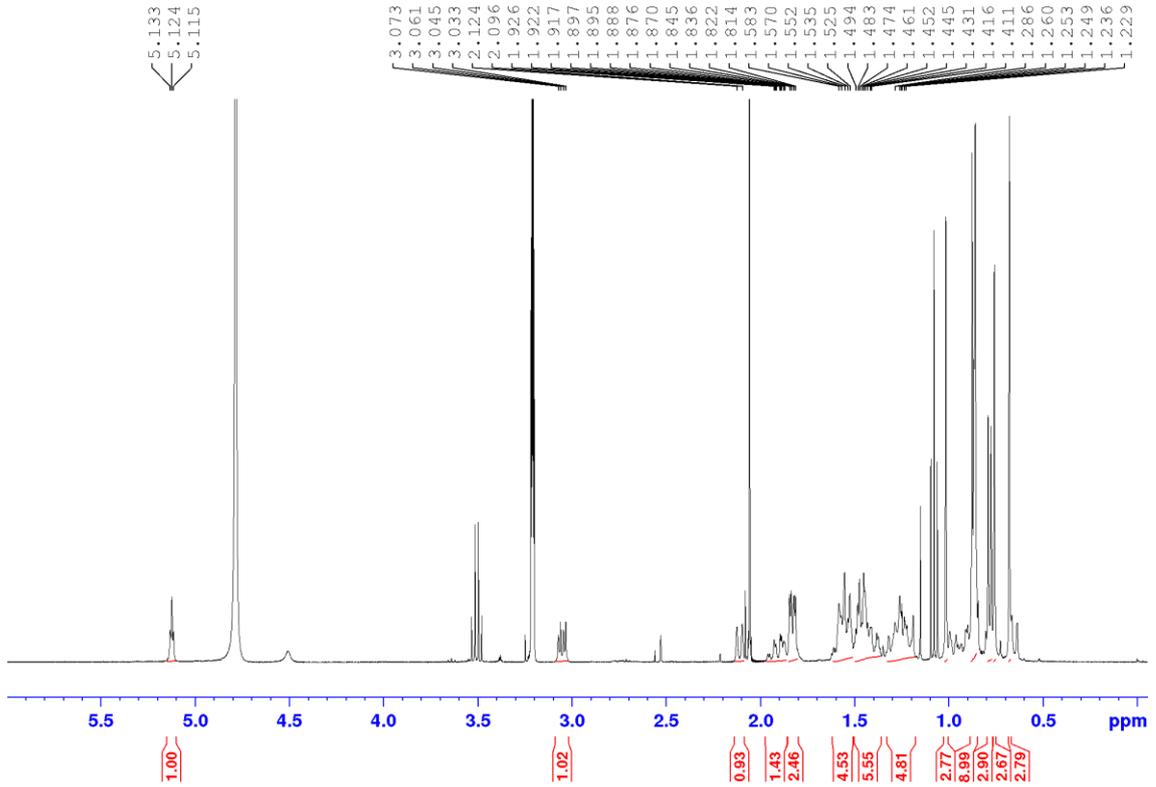


Figura 15: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) do ácido ursólico.

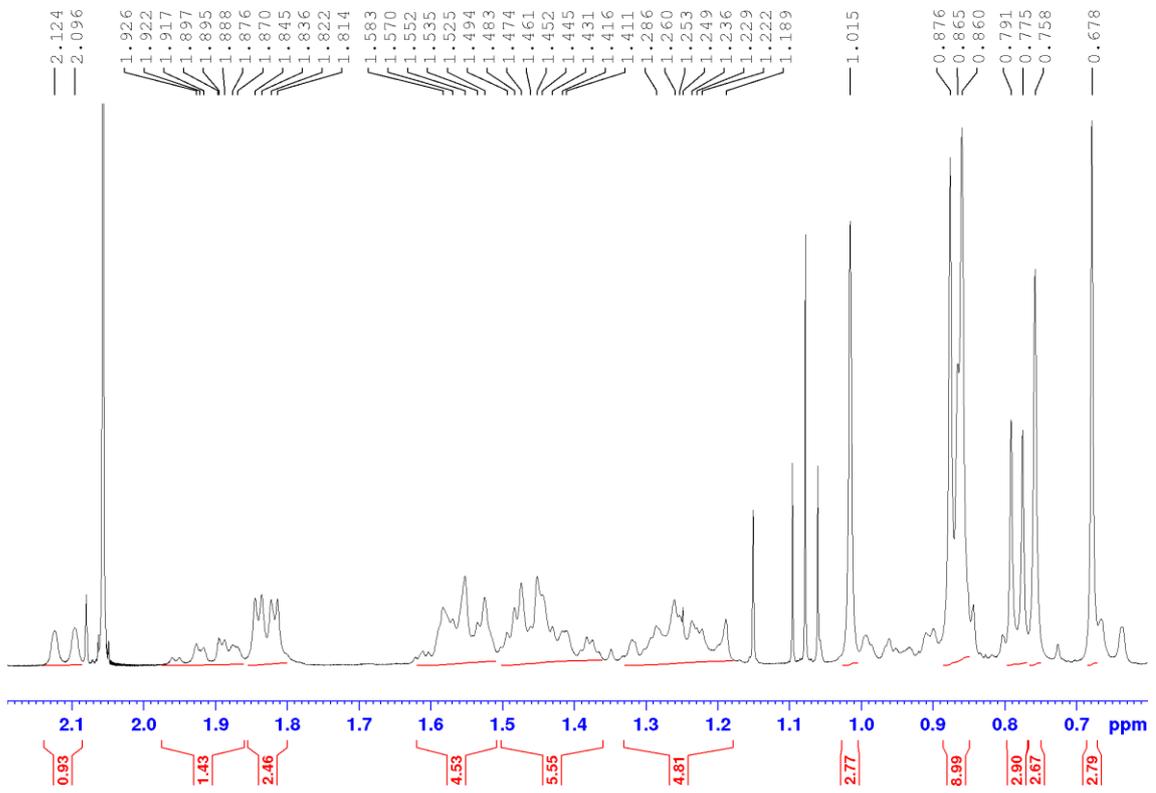


Figura 16: Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) do ácido ursólico.

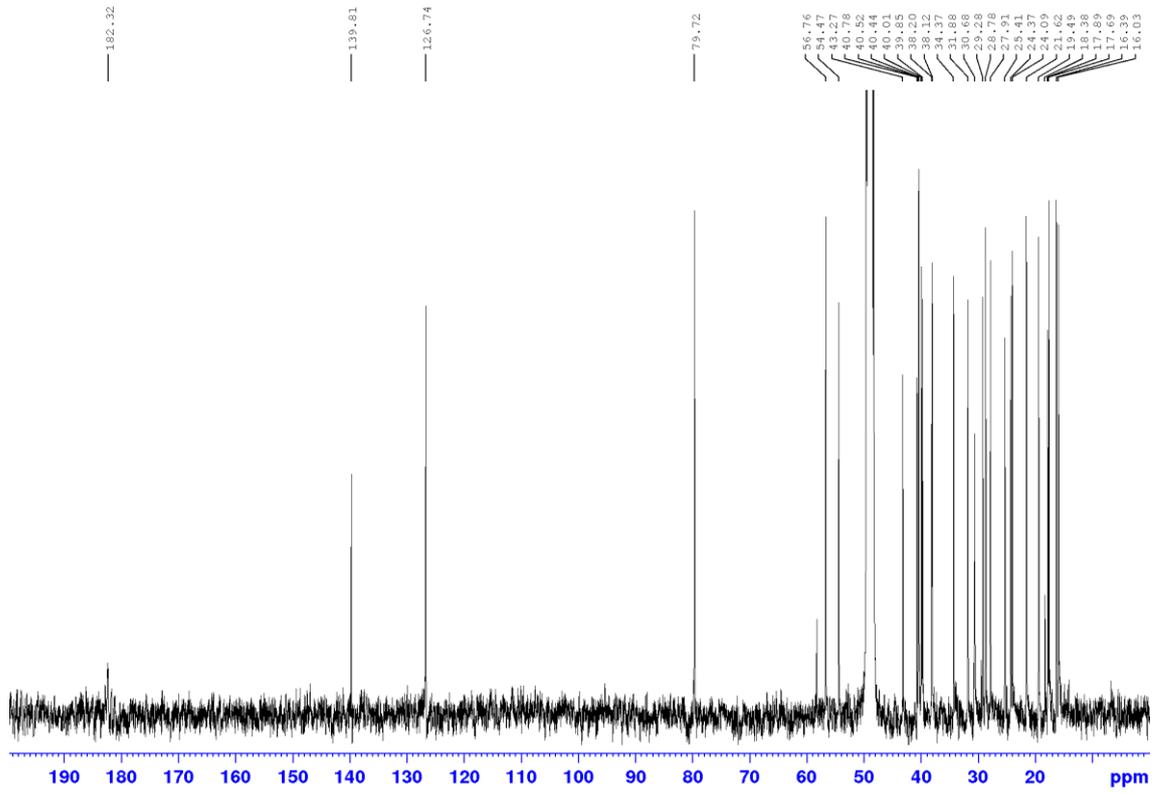


Figura 17: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz) do ácido ursólico.

**Tabela 4:** Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o Ácido oleanólico (2) e Ácido ursólico (3) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (MARTINS, 2003).

Position	Oleanolic acid			Ursolic acid		
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicity)	$\delta_{\text{C}}$ Literature [7]	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicity)	$\delta_{\text{C}}$ Literature [7]
1	38.5	1.63 (m)	39.0	38.6	1.72 (m)	39.2
2	28.1	1.60 (m)	28.1	28.2	1.60 (m)	28.2
3	79.1	3.23 (dd; $J = 10.7; 4.7$ Hz)	78.2	78.7	3.22 (dd; $J = 10.8; 4.9$ Hz)	78.2
4	38.8	—	39.4	38.5	—	39.6
5	55.3	0.74 (m)	55.9	55.2	1.34 (m)	55.9
6	18.8	1.54 (m)	18.8	18.3	1.60 (m)	18.8
7	32.7	1.49 (m)	33.4	32.9	1.72 (m)	33.7
8	39.3	—	39.8	39.5	—	40.1
9	47.6	1.54 (m)	48.2	47.3	1.60 (m)	48.1
10	37.0	—	37.4	37.0	—	37.5
11	23.8	0.94 (m)	23.8	23.7	1.91 (m)	23.7
12	122.8	5.31 (dd; $J = 3.6; 3.5$ Hz)	122.6	125.9	5.27 (dd; $J = 3.6; 3.5$ Hz)	125.7
13	143.5	—	144.8	137.9	—	139.3
14	41.5	—	42.2	42.0	—	42.6
15	27.7	1.60 (m)	28.4	28.1	1.60 (m)	28.8
16	23.7	0.94 (m)	23.8	25.0	1.34 (m)	25.0
17	46.7	—	46.7	48.1	—	48.1
18	42.1	2.82 (m)	42.1	53.8	2.2 (m)	53.6
19	46.0	2.87 (m)	46.6	38.5	1.00 (m)	39.5
20	31.0	—	31.0	38.5	0.95 (m)	39.4
21	33.9	1.62 (m)	34.3	30.3	1.27 (m)	31.1
22	33.2	1.30 (m)	33.2	37.4	1.72 (m)	37.4
23	28.0	1.00 (s)	28.8	28.9	1.00 (s)	28.8
24	16.8	0.79 (s)	16.5	15.6	0.79 (s)	16.5
25	15.3	0.93 (s)	15.6	15.4	0.94 (s)	15.7
26	17.1	0.79 (s)	17.5	17.1	0.82 (s)	17.5
27	26.0	1.16 (s)	26.2	23.5	1.10 (s)	24.0
28	180.0	—	180.0	179.6	—	179.7
29	33.1	0.92 (s)	33.4	17.0	0.87 (d; $J = 6.4$ Hz)	17.5
30	23.7	0.94 (s)	23.8	21.4	0.97 (d; $J = 6.3$ Hz)	21.4

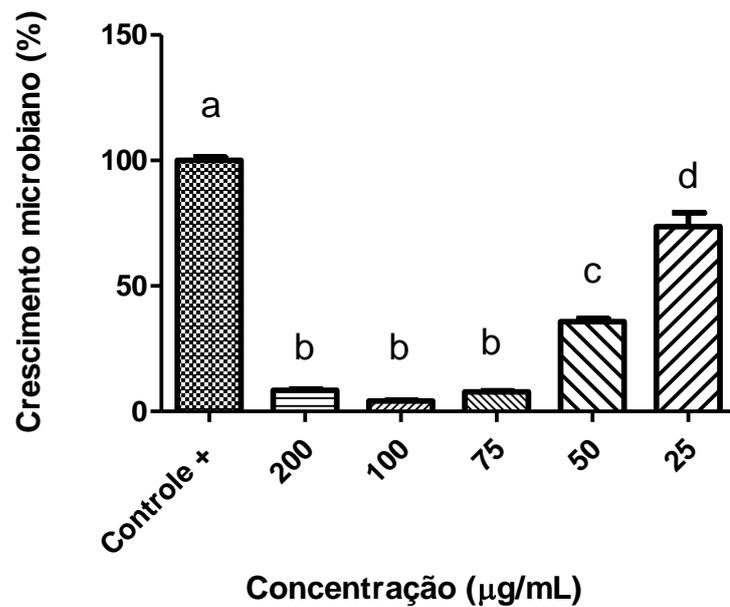
O ácido ursólico é um triterpeno pentacíclico (grupo dos ursanos) de ocorrência em vários vegetais de diferentes famílias. Tem fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$  e peso molecular 456,68 g/mol (COSTA, 2008). Esse terpenóide tem atraído considerável interesse devido as suas promissoras propriedades biológicas como quimioterápico, quimiopreventivo, anti-inflamatório (influenciando a ação do óxido nítrico sintase e ciclooxigenase), antimicrobiana, e inibidor de mutação em bactérias. Além disso, derivados do ácido ursólico, especialmente os dicarboxílicos, exibem atividade frente ao vírus HIV (embora seja levemente tóxico), através da inibição da dimerização da protease. Também exibem atividade citotóxica inibindo o crescimento de células tumorais in vivo, sendo um potencial candidato para tratamento e prevenção de câncer de pele e melanoma por indução a apoptose. Além de apresenta uma baixa ou nenhuma toxicidade, sendo, inclusive, utilizado

como aditivo em bebida, alimento e em cosmético (VECHIA, 2009; DENG, 2008; LEUNG, 1996).

Derivados ursólicos acilados no carbono C-3, em configuração beta, apresentam importante contribuição para semi-síntese de compostos que apresentam atividades biológicas. Observa-se que os grupos funcionais presentes no C-3 e C-28 são as principais posições responsáveis pela atividade citotóxica do ácido ursólico e dos ácidos triterpenicos em geral. Substituintes doadores de ligação de hidrogênio no carbono C-3 e C-28 são essenciais para a ampliação dessa capacidade, assim como o aumento da hidroxilação na cadeia (MENG, 2009, VECHIA, 2009). Entretanto, apenas uma quantidade limitada de derivados sintéticos apresenta bioatividade. Uma série de novos derivados do ácido ursólico ainda necessita ter a correlação estrutura-atividade analisadas. (DENG, 2008).

#### **5.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias isoladas**

Após avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias isoladas, determinou-se a concentração inibitória mínima para o ácido ursólico, uma vez que este foi o único composto que inibiu o crescimento microbiano na concentração de 200 µg/mL. A concentração inibitória mínima para o ácido ursólico foi de 100 µg/mL, como pode ser observado no Gráfico 16. Foi considerada como concentração inibitória mínima aquela que inibiu o crescimento microbiano em pelo menos 95%. Em concentrações menores também se observou a inibição do crescimento microbiano. Pode-se dizer que houve um efeito concentração dependente, pois se observa um aumento significativo da atividade antimicrobiana na faixa de 25 a 75 µg/mL.



**Gráfico 16:** Efeito do ácido ursólico frente à cepa *S. aureus* resistente a meticilina. As concentrações do ácido ursólico variaram de 25 a 200 µg/mL. Cada coluna representa a média dos experimentos realizados em duplicata. Letras diferentes indicam que há diferença estatística significativa (ANOVA seguido do teste de Tukey).

Na literatura não há uma classificação consensual sobre os valores de CIM. Aligiannis e colaboradores (2001) apresentaram a seguinte classificação: CIM menores que 0,5 mg/mL são inibidores potentes; CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL são inibidores moderados; CIM acima de 1,6 mg/mL são inibidores fracos. Enquanto Webster e colaboradores (2008) propuseram um valor de CIM satisfatório entre 1 mg/mL ou menos. Seguindo a classificação de Aligiannis, o ácido ursólico é um inibidor potente considerando que a sua CIM < 500 µg/mL.

O ácido ursólico e seu isômero, ácido oleanólico, pertencem à classe de compostos triterpenóides e são amplamente distribuídos no reino vegetal (VASCONCELOS et al, 2006). Durante a última década muitos artigos foram publicados, refletindo o grande interesse e progresso no entendimento destes triterpenóides. Isso inclui o isolamento e purificação de várias plantas, modificações químicas, pesquisas farmacológicas e estudos toxicológicos (LIU, 2005).

Dentre as inúmeras atividades biológicas atribuídas aos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico, diferentes estudos relatam a atividade analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante (VASCONCELOS et al., 2003; KANG et al., 2008; IKEDA et al., 2008).

Horiuchi e colaboradores (2007) relataram a atividade antimicrobiana do ácido ursólico sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. As concentrações inibitórias mínimas foram respectivamente: 2,5 mg/mL, 3,75 mg/mL,  $7,3 \times 10^{-3}$  mg/mL e 0,01 mg/mL. A CIM frente a *S. aureus* foi menor do que a observada neste trabalho (0,1 mg/mL).

Em 2008, Fontanay e colaboradores testaram o ácido ursólico em sua apresentação comercial frente a cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foram encontrados valores de CIM que demonstraram potente atividade do ácido ursólico frente às cepas de *S. aureus* e de *E. faecalis*. Para *S. aureus* a CIM foi de 8 µg/mL. Silva Filho e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato bruto diclorometânico das folhas de *Baccharis dracunculifolia* sobre *S. aureus* e obtiveram uma concentração inibitória mínima com crescimento de 50% das bactérias (CIM<sub>50</sub>) de 100 µg/mL, sendo essa atividade atribuída ao ácido ursólico presente no extrato.

Horiuchi e colaboradores (2007) ainda ressaltam que o ácido ursólico é 175 vezes mais ativo que o seu isômero, o ácido oleanólico, contra bactérias gram-positivas, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho, onde se observou que o ácido ursólico é um potente inibidor e que o ácido oleanólico não apresentou atividade devido à baixa concentração testada (0,5 mg/mL).

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados sugerem que as folhas da planta *M. pectinatum* detêm constituintes químicos que podem ser capazes de suprimir o crescimento de microrganismos patógenos como, por exemplo, *S. aureus*, uma bactéria patogênica do sistema respiratório.

A investigação fitoquímica da *M. pectinatum* resultou no isolamento bioguiado, por meio da cromatografia, do ácido ursólico, oleanólico e o micromérico. O ácido micromérico foi isolado pela primeira vez nesta espécie, sendo poucos os relatos na literatura sobre a atividade biológica deste composto, incentivando assim estudos mais aprofundados a fim de contribuir com o estudo fitoquímico da *M. pectinatum*. O ácido ursólico e oleanólico são triterpenos que já foram isolados da espécie *M. pectinatum* e de outras espécies vegetais. Isso mostra que esta metodologia é de grande valia para a busca racional de substâncias com atividade biológica.

Apesar das inúmeras atividades biológicas apresentadas pelas substâncias isoladas já descritas na literatura, são necessários estudos mais aprofundados para melhor entendimento das suas atividades biológicas, como também dos mecanismos moleculares envolvidos para que elas possam ser empregadas com segurança e eficácia.

Este trabalho demonstrou o potencial antimicrobiano da *M. pectinatum* em especial contra *S. aureus* e *S. aureus* resistente a metilina devido à importância desse microrganismo para a Saúde Pública. O conhecimento da atividade antimicrobiana é importante para determinar o perfil biológico da planta e para estudos futuros que visam à obtenção de um novo fitoterápico ou mesmo um medicamento sintético produzido a partir de seus compostos.

## 7. REFERÊNCIAS

ALONSO-CASTRO, A. J.; VILLARREAL, M. L.; SALAZAR-OLIVO, L. A.; et al. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 945-972, 2011.

ALTINIER, G.; SOSA, S.; AQUINO, R. P.; MENCHERINI, T.; et al. Characterization of topical anti-inflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1718-1723, 2007

BAHIA, M. V. Estudo químico de *Caesalpinia pyramidalis*. (Leguminosae). Salvador: UFBA, 2002, 104 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2002.

BARBOSA-FILHO, J.M.; ALENCAR, A.A.; NUNES, X.P.; et al. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 135-154, 2008.

BASÍLIO, I. J. L. D. Estudo Farmacobotânico Comparativo das Folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta farmacêutica bonaerense**, v. 25, p. 518-525, 2006.

BAUER A. W; KIRBY W. M; SHERRIS J. C; et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BISPO, M. D.; MOURÃO, R. H. V.; FRANZOTTI, E. M.; et al. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 81-86, 2001.

BOALINO, D. M.; CONNOLLY, J. D.; MCLEAN, S.; et al.  $\alpha$ -Pyrone and a 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1303-1307, 2003.

CARVALHO, I. B. M. de. O uso popular de plantas medicinais da caatinga do povoado de Curitiba: município do Canindé do São Francisco, Sergipe. 1999. 128f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Núcleo de Pós-Graduação em Estudos do Semi-Árido, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/Univali. **Química Nova**, v. 23, p. 680-685, 2000.

Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia. Banco de Dados Composto PubChem; CID = 73242194, Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/73242194> > Acesso em: 22 de fevereiro de 2018.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature Publishing Groups**, Paris, v. 432, p. 829 – 837, 2004.

COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post – Antimicrobial era. **Science**, v. 257, p. 1050-1055, 1992.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas: UNICAMP, 1997. p. 279.

CORBELLA X., et al. Staphylococcus aureus nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. **Journal Clinical Microbiology**. v. 16, p. 351-357, 1997.

CORDEIRO, Risonildo Pereira. Perfil de Sensibilidade / Resistência de cepas de Staphylococcus aureus MRSA do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife. Recife, 2004, 69 f. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

COSTA, H. N. R. da; SANTOS, M. C. dos. **Constituintes químicos e atividade antiedematogênica de Peltodon radicans (Lamiaceae)**, Quim. Nova, v. 31, p. 744-750, 2008.

COSTA, V. B.; COUBE, C. S.; MARINHO, B. G.; et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of Bouchea fluminensis. 2003.

CRUZ, M. da C. S. Avaliação da atividade antifúngica de plantas utilizadas popularmente pela comunidade de Curitiba, Município de Canindé de São Francisco – SE. 2002. 145f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Núcleo de Pós-Graduação em Estudos do Semi-Árido, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe.

CUSHINE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G.; The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39-44, 2003

DANTAS, Z. M. R.; OLIVEIRA, E.; VASCONCELOS-FILHO, P. A.; et al. Susceptibilidade in vitro de espécies de *Candida* à maleimidazóis, naftalimidazóis e succimidazóis. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 81, p. 31-35, 2000.

DE QUEIROZ, A. C.; DIAS, T. L. M. F.; DA MATA, C. B. B.; et al. Antileishmanial Activity of Medicinal Plants Used in Endemic Areas in Northeastern Brazil. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

DENG, S. L., BAGLIN, I. Synthesis of Phosphono dipeptide Conjugates of Ursolic Acid and Their Homologs. **Heteroatom Chemistry**, v. 19, 2008.

DORMAN, H.J.D., DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308–316, 2000.

FALCÃO, D. Q. Estudo Químico e Farmacológico de Quatro Espécies de *Hyptis* do Estado do Rio Grande do Sul. 2003. 148f. Dissertação (MSc. Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 84, p. 69-74, 2003.

FRAGOSO-SERRANO, M.; GIBBONS, S.; PEREDA-MIRANDA, R. Anti-staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. **Planta Medica**, v. 71, p. 278-280, 2005.

GIBBONS, S., OHLENDORF, B., JOHNSON, I. The Genus *Hypericum*-available resource of anti-Staphylococcal Leads. **Fitoterapia**, v. 73, p. 300-304, 2002.

GILANI, A.H.; ATTA-UR-RAHMAN. Perspectives of ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 43-49, 2005.

GONZALEZ, P.A. Vigilância de la resistência a antimicrobianos. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 19, p. 135-139. 2002.

HICHRI, F.; JANNET, H. B.; et al. Antibacterial activities of a few prepared derivatives of oleanolic acid and of other natural triterpenic compounds. *Comptes Rendus Chimie*, v. 6, p. 473- 483, 2003.

HORIUCHI, K.; SHIOTA, S.; KURODA, T.; HATANO, T.; et al. Potentiation of Antimicrobial Activity of Aminoglycosides by Carnosol from *Salvia officinalis*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 287-290, 2007.

HOSTETTMANN, K., QUEIROZ, F. E., VIEIRA, C. P., **Princípios Ativos de Plantas Superiores**, São Carlos: EdUFSCar, 2003. (Séries de textos da Escola de Verão em Química, vol. IV).

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: na anti- and pro-inflammatory triterpenoid. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, p. 26-42, 2008.

JONGE P., et al. Molecular aspects of Meticillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 33, p. 7-24, 1994.

KANG, S. Y.; YOON, S. Y.; ROH, D. H.; et al. The anti-arthritic effect of usoric acid on zymosan-induced acute inflammation and adjuvante-induced chronic arthritis models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 1347-54, 2008.

KUNIN, C.M. Resistance to antimicrobial drugs – A worlswilde calamity. **Annal of Internal Medicine**, v. 118, p. 557-561, 1993.

LEUNG; A.Y.; FOSTER S. **Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drug and cosmetics**. 2<sup>a</sup> ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 810 p., 1996.

LINDSAY, J. A., HOLDEN, M. T. G. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? **Trends in Microbiology**, v. 12, p. 378-385, 2004.

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 92-94, 2005.

LLOP, A.; TAMARGO, I.; PÉREZ, M.; et al. **Resistencia a los antimicrobianos y vigilancia microbiológica em Cuba.** In: Resistencia antimicrobiana em las Américas: magnitud del problema y su contención. Washington D.C.: Pan American Health Org, p. 116-123, 2001.

LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, p. 371-376, 2005.

LOWY, F. D. Medical progress: Staphylococcus aureus infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 520-532, 1998.

MARTÍNEZ, A. L., GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E., CHÁVEZ, M., PELLICER, F. Antinociceptive effectiveness of triterpenes from rosemary in visceral nociception. **Journal of Ethnopharmacology**, 142, p. 28–34, 2012.

MARTINS D.; CARRION L. L.; RAMOS D.F.; et al. Triterpenes and the antimycobacterial activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). **BioMed Research International**, Article ID 605831, p. 7, 2013.

MELO JÚNIOR, E. J. M. de; RAPOSO, M. J.; SANT'ANA, A. E. G.; et al. **Estudo de plantas medicinais com atividade antimicrobiana sobre microrganismos presentes na alveolite.** Revista ABO Nacional. v. 8, p. 220-226, 2000.

MORI, S. A.; MATTOS-SILVA, L. A.; LISBOA, G.; et al. **Manual de Manejo do Herbário Fanerogâmico.** 2ª ed. CEPLAC, Ilhéus, 183 p., 1985.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Report**, v. 17, p. 215-234, 2000.

OLIVEIRA, A.K.M.; OLIVEIRA N.A.; RESENDE U.M.; et al. Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Patanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 71, p. 283-289, 2011.

OLIVEIRA G.L.; OLIVEIRA A.F.M.; ANDRADE L.H.C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p. 571-577, 2010.

ORTH, H. C. J.; RENTEL, C.; SCHMIDT, P. C. Isolation, Purity Analysis and Stability of Hyperforin as a Standard Material from *Hypericum perforatum* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 193-200, 1999.

PALOMBO, E. A., SEMPLE, S. J. Antibacterial activity of Australian plant extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Journal Basic Microbiology**, v. 42, p. 444-448, 2002.

PEREDA-MIRANDA, R.; HERNANDEZ, L.; VILLAVICENCIO, M. J.; et al. Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro- -pyrones from *Hyptis pectinata*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 583-593, 1993.

PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; CARDIGA, E.A.; et al. Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp.* Isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003. Instituto Adolf Lutz. Publicação online, 2007.

PESSINI, G. L.; Holetz, F. D.; Sanches, N. R.; et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizadas na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 21-24, 2003.

PINHEIRO, M. A.; MAGALHÃES, R. M.; TORRES, D. M.; et al. Gastroprotective effect of alpha-pinene and its correlation with antiulcerogenic activity of essential oils obtained from *Hyptis* species. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, p. 123-130, 2015.

QUEIROZ, S., N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F.; Métodos de Extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.

RAHMAN, S.Z.; SINGHAL, K.C. Problems in pharmacovigilance of medicinal products of herbal origin and means to minimize them. **Uppsalla Reports** 17, 2002.

RAJENDRAN, N.K.;RAMAKRISHNAN. In vitro evaluation of antimicrobial activity of crude extracts of medicinal plants against multi drug resistant pathogens. **Biyoloji Bilimleri Araptyrma Dergisi**, v. 2, p. 97-101, 2009.

RIBEIRO, A.Q.; LEITE, J.P.V.; DANTAS-BARROS, A.M. Perfil da utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 65-70, 2005.

ROJAS, A.; HERNANDEZ, L.; PEREDA-MIRANDA, R.; et al. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, p. 275-83, 1992.

SADERI, H., OWLIA, P., SHANRBANOOIE, R.. Vancomycin Resistance Among Clinical Isolates of Staphylococcus aureus. **Archives Iranian Medicine**, v.8, p. 100-103, 2005.

SANTOS, P. O.; COSTA, M. J. C.; ALVES, J. A. B.; et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. **Química Nova**, v. 31, p. 1648-1652, 2008.

SARKER, S. D., LATIF, Z.; GRAY, A. **Natural Products Isolation**. 2<sup>a</sup> ed, Editora Human Press, New Jersey, USA, 2006, 515 p.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: UFSC, 2000.

SERAFIN, C. Estudo da composição químicas e das propriedades biológicas das partes aéreas de *Plinia glomerata*. Itajaí-SC: UNIVALI, 2006. 83 f. Dissertação de Mestrado, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 618-626, 2008.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessidade da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 35-40, 2002.

SMITH, D.L.; HARRIS, A.D.; JOHNSON, J.A.; et al. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. National Academy Sciences. Publicação online, 2002.

SOUZA, M. M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER, M. B.; et al. **Método de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos**. Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Ed. Univali; 239 p., 2003.

SPORN, M. B.; NANJOO, S. Chemoprevention of cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 525-530, 2000.

STAPLETON, P. D., et al. Modulation of  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 462-467, 2004.

TAYLOR, P. W.; STAPLETON, P. D.; PAUL, L. J. New ways to treat bacterial infections. **Drug Discovery Today**, v. 7, p. 1086-1091, 2002.

TROVÃO, D. M., et al. Estudo comparativo entre três fisionomias da caatinga no estado da Paraíba e análise do uso das espécies vegetais pelo homem nas áreas de estudo. **Revista de Biologia e ciências da terra**, v. 4, p. 2, 2004.

VALENZUELA, E.F.; MALDONADO, C.S.; PAREDES, J.G. Actividade antifúngica de quitosano carbamato de etilo em *Candida albicans*. **Boletín Micológico**, v. 18, p. 105-110, 2003.

VASCONCELOS, M. A. L; FERREIRA, D. S.; SILVA, M. L. A.; et al. Analgesic effects of crude extracts of *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Bolletino Chimico Farmacêutico**, v. 142, p. 333-335, 2003.

VASCONCELOS, M. A. L.; ROYO, V. A.; FERREIRA, D. S.; *et al.* Evaluation of the In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of usoric acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 61, p. 477-482, 2006.

VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B. Derivados oleanos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, p. 1245-1252, 2009.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B.; **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**, Chapecó: Argos. p. 584, 2001.