



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**GABRIELLY GALDINO CONRADO**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Protium hebetatum* D. C. DALY POR**  
**FRACIONAMENTO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO**

**MANAUS**  
**2014**

**GABRIELLY GALDINO CONRADO**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Protium hebetatum* D. C. DALY POR  
FRACIONAMENTO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio- INPA  
Co-Orientadora: Profa.<sup>a</sup> Dra.<sup>a</sup> Karen Carim Regina da Costa- UFAM  
Colaboradores: Profa.<sup>a</sup> MSc. Fernanda Guilhon Simplicio- UFAM  
Profa.<sup>a</sup> Dra.<sup>a</sup> Vera Lúcia Garcia Rehde- UNICAMP**

**MANAUS  
2014**

**GABRIELLY GALDINO CONRADO**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Protium hebetatum* D. C. DALY POR  
FRACIONAMENTO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação 24/02/2014

Banca Examinadora:

---

Dr. Paulo de Tarso  
Universidade do Estado do Amazonas

---

Dra.<sup>a</sup> Ana Frazão Teixeira  
Universidade do Estado do Amazonas

---

Dra.<sup>a</sup> Ieda Hortêncio Batista  
Universidade do Estado do Amazonas

**MANAUS  
2014**

Ficha Catalográfica

C754e Conrado, Gabrielly Galdino

Estudo da atividade antibacteriana de *Protium hebetatum* D. C. Daly por fracionamento fitoquímico biomonitorado. / Gabrielly Galdino Conrado. -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2014.  
xviii, 87f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Amazonas – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2014. Orientador: Pf. Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio.

1. *Protium hebetatum*. 2. Atividade antibacteriana. 3. *Staphylococcus aureus*. I. Sampaio, Paulo de Tarso Barbosa. II. Título.

CDU: 604

Ficha catalográfica elaborada por  
Maria Eliana N. Silva – CRB- 11/248

*Dedico essa dissertação e esses dois anos de estudos primeiramente a Deus e a toda minha família, principalmente aos meus pais, Silvana e Oscar.*

*“Concretizar nossos sonhos é a melhor forma de não desistir de realizar tantos outros.”*  
(Marcella Brafmam)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus por tudo que tem me concedido.

Aos meus pais, Silvana e Oscar, pelo apoio, pela educação e pelo amor dedicado em toda minha vida.

A minha colaboradora Profa<sup>a</sup>. MSc. Fernanda Guilhon Simplicio, que assumiu o papel de minha orientadora, e me ajudou em tudo, desde o acesso aos laboratórios até as correções de plano de atividades, resumos, dissertação, pelas prévias de apresentação, por estar sempre disposta a tirar minhas dúvidas e por sempre querer o meu melhor.

A minha co-orientadora Profa<sup>a</sup>. Dra<sup>a</sup>. Karen Costa, que me ensinou muito sobre práticas de microbiologia e sempre separava um tempinho para sentar comigo na câmara de fluxo para fazermos juntas os testes que eu não sabia.

A minha colaboradora Profa.<sup>a</sup> Dra<sup>a</sup>. Vera Lúcia, que abriu as portas do seu laboratório, o mais bem equipado que já vi, para me ensinar novas técnicas de Fitoquímica, por ter me recebido tão bem em um dos melhores centros de pesquisas do Brasil e por dispor do seu preciosíssimo tempo para me ajudar na última etapa dos meus experimentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo de Tarso, que não é muito dessa linha de pesquisa, mas confiou em mim e aceitou me orientar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia - UEA, em especial a Secretaria e a Coordenação, que me ajudaram a resolver todos os problemas burocráticos e por me oferecer oportunidades para enriquecer meus conhecimentos.

A FAPEAM, pela bolsa concedida.

Aos meus colegas de laboratório, Chanderlei Tavares, Gabriel Oliveira, Tallita Machado, Eloisa Silva, Maria Carolina, Marcos Gurgel, pela amizade, ajuda de todos vocês nas práticas laboratoriais e por me confortar dizendo que no final tudo ia da certo.

Ao meu namorado Vinicius Antonioli, que sempre esteve ao meu lado, mesmo que às vezes distante, me apoiando e me encorajando.

A todos que contribuíram direta e indiretamente nessa etapa da minha vida, do meu processo ensino aprendizagem.

Muito Obrigado a todos!

## RESUMO

O aparecimento de novos mecanismos de resistência bacteriana a antimicrobianos disponíveis no mercado tem gerado uma corrida das indústrias farmacêuticas para a produção de novos compostos que atuem por mecanismo de ação diferente aos fármacos em uso. As plantas são consideradas uma fonte importante na descoberta de novos antibióticos devido à grande diversidade e complexidade molecular dos metabólitos biossintetizados, superior àquela derivada dos processos de síntese química. *Protium hebetatum* D. C. Daly (Burseraceae) é uma árvore encontrada principalmente no Norte do Brasil, Peru e Venezuela. Assim, considerando a urgência na busca de novas drogas para o tratamento de infecções bacterianas e o reconhecido potencial antibacteriano de vários extratos vegetais, esse projeto realizou um estudo fitoquímico biomonitorado por atividade antibacteriana de extratos e frações obtidos das folhas e galhos da espécie *P. hebetatum*, visando identificar e/ou isolar substâncias com atividade antibacteriana, determinando sua concentração inibitória mínima. Foi realizada a triagem da atividade antibacteriana dos extratos hexano, acetato de etila e metanol de folhas e galhos a partir do método difusão em poço, onde o extrato metanol dos galhos foi ativo contra *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris*, apresentando o halo de inibição de 13 mm. O mesmo foi particionado com hexano, diclorometano e acetato de etila, gerando as respectivas amostras que foram novamente prospectadas pelo mesmo método. A partição diclorometano apresentou halo de inibição de 13 mm contra *Staphylococcus aureus* e 11,3 mm contra *Enterococcus faecalis*. A partição diclorometano foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica gerando 10 frações, que juntamente com o extrato metanol e a própria partição, tiveram sua CIM determinada pelo método de microdiluição em caldo. O extrato metanol apresentou CIM de 1 mg/mL contra *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *E. faecalis*. A partição e as frações F1, F2, F5 e F6 apresentaram CIM de 1 mg/mL contra *S. aureus*. A partição diclorometano apresentou CIM de 0,5 mg/mL contra a *E. faecalis*. Através da técnica de cromatografia em camada delgada preparativa e análises por cromatografia gasosa acoplada em espectrometro de massas (CG-EM), foram isolados os compostos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina e estigmasterol, e identificada a escopoletina, que estão entre as substâncias responsáveis pela atividade antibacteriana de *P. hebetatum*. Entretanto, os resultados indicam que, de forma geral, o extrato metanol dos galhos, que contém a mistura dessas substâncias, é mais ativo que as amostras obtidas do seu fracionamento, sugerindo que essa atividade se deve a uma ação sinérgica desses compostos. Ainda empregando a análise por CG-EM, foi possível identificar isoeugenol, *p*-vinilguaiacol, metoxieugenol, coumarana, 5-hidroxi-escopoletina, 4,7-diidroxi-6-metoxicromam-2-ona, piperonal, escoparona, *o*-guaiacol, espatulenol, siringol e antiarol, todas identificadas pela primeira vez nessa espécie. Os resultados deste estudo, portanto, sugerem grande potencial farmacológico e tecnológico para *Protium hebetatum*.

**Palavras-chave:** *Protium hebetatum*, atividade antibacteriana, *Staphylococcus aureus*, escopoletina,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e estigmasterol.

## ABSTRACT

The emergence of new mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents available in the market has spawned a race between pharmaceutical industries for the production of novel compounds that act by distinct mechanisms to those present in existing drugs. Plants are considered a major source of discovery of new antibiotics due to the large molecular diversity and complexity of the biosynthesized metabolites, which is higher than that derived from chemical synthesis processes. *Protium hebetatum* D. C. Daly (Burseraceae) is a tree found mainly in the North of Brazil, Peru and Venezuela in upland forests. Considering the urgency of the search for new drugs for the treatment of bacterial infections and recognized antimicrobial activity of various plant extracts, this work conducted a biomonitoring phytochemical study of antibacterial activity of extracts and fractions obtained from the leaves and branches of the species *P. hebetatum*, in order to identify and / or isolate substances with antibacterial activity by determining their minimum inhibitory concentration. Screening of the antibacterial activity of hexane, methanol and ethyl acetate extracts from leaves and branches by diffusion method, where the methanol extract of the branches was active against *Escherichia coli* and *Proteus vulgaris* showing the zone of inhibition of 13 mm. The same was partitioned with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, generating respective samples were again screened by the same method. The dichloromethane partition showed inhibition zone of 13 mm against *Staphylococcus aureus* and 11, 3 mm against *Enterococcus faecalis*. The dichloromethane partition was subjected to fractionation by column chromatography generating 10 fractions, which together with the methanol extract and partition, had its MIC determined by the broth microdilution method. The methanol extract showed MIC of 1 mg/mL against *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *E. faecalis*. The partition and F1, F2, F5 and F6 fractions showed MIC of 1 mg/mL against *S. aureus*. The partition dichloromethane showed a MIC of 0.5 mg/mL against *E. faecalis*. By the technique of preparative thin layer chromatography and the analyzes performed by gas chromatography coupled to mass spectrometer (GC-MS), the  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin and stigmasterol compounds were isolated, and identified the scopoletin, which are among the substances responsible for the antibacterial activity of *P. hebetatum*. However, the results indicate that, in general, the methanol extract of the branches, containing the mixture of these substances, is more active than the samples obtained from its fractionation, suggesting that this activity is due to a synergistic action of these compounds. Even employing the analysis by GC-MS, it was possible to identify isoeugenol, *p*-vinylguaiacol, methoxyeugenol, coumarin, 5-hydroxy-scopoletin, 4,7-dihydroxy-6-methoxycoumarin-2-one, piperonal, escoparone, *o*-guaiacol, spathulenol, syringol and antiarol, all first identified in this species. Thus, the results of this study suggest great pharmacological and technological potential for *Protium hebetatum*.

**Keywords:** *Protium hebetatum*, antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*, scopoletin,  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin and stigmasterol.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>µL</b>	Microlitro
<b>ABHI</b>	Ágar Brain Heart Infusion
<b>AcOEt</b>	Acetato de Etila
<b>AMH</b>	Ágar Mueller-Hinton
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Colection</i>
<b>CBHI</b>	Caldo Brain Heart Infusion
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CCDP</b>	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
<b>CG</b>	Cromatografia Gasosa
<b>CG-MS</b>	Cromatografia Gasosa acoplada em Espectometria de Massas
<b>CHCL</b>	Clorofórmio
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMH</b>	Caldo Mueller-Hinton
<b>CPQBA</b>	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ESA</b>	Escola Superior de Ciências da Saúde
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>Hex</b>	Hexano
<b>INPA</b>	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
<b>mg</b>	Miligrama
<b>min</b>	Minutos
<b>mm</b>	Milímetro
<b>MM</b>	Massa Molecular
<b>mmHg</b>	Milímetro de mercúrio
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>PAcOET</b>	Partição acetato de etila
<b>PDCM</b>	Partição diclorometano
<b>PHex</b>	Partição hexano

<b>PHidro</b>	Partição hidrometanólica
<b>RPM</b>	Rotação por Minuto
<b>t<sub>R</sub></b>	Tempo de retenção
<b>TTC</b>	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
<b>UEA</b>	Universidade do Estado do Amazonas
<b>UFAM</b>	Universidade Federal do Amazonas
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>UV</b>	Ultra Violeta

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Critério de categorização da atividade antibacteriana.....	33
Tabela 2.	Rendimento dos extratos das folhas e galhos da espécie <i>P. hebetatum</i> .....	50
Tabela 3.	Resultado da prospecção fitoquímica de galhos e folhas de <i>P. hebetatum</i> .....	51
Tabela 4.	Atividade antibacteriana dos extratos de galhos e folhas de <i>P. hebetatum</i> .....	52
Tabela 5.	Rendimento das frações provenientes do extrato metanólico dos galhos de <i>P. hebetatum</i> .....	53
Tabela 6.	Atividade antibacteriana das partições provenientes do extrato metanólico dos galhos.....	53
Tabela 7.	Frações obtidas da coluna cromatográfica da fração diclorometânica e seus rendimentos.....	55
Tabela 8.	Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato metanólico dos galhos de <i>P. hebetatum</i> .....	56
Tabela 9.	Concentração inibitória mínima da fração diclorometânica e suas frações subsequentes.....	57
Tabela 10.	Compostos presentes na F1 de <i>P.hebetatum</i> , massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas.....	62
Tabela 11.	Compostos presentes na amostra B1 de <i>P.hebetatum</i> , massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas.....	64
Tabela 12.	Compostos presentes na amostra B2 de <i>P.hebetatum</i> , massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas.....	65
Tabela 13.	Compostos presentes na FDCM de <i>P.hebetatum</i> , massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas.....	67
Tabela 14.	Compostos presentes na F2 de <i>P.hebetatum</i> , massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas.....	68

Tabela 15.	Compostos presentes na F3 de <i>P.hebetatum</i> , massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas.....	69
Tabela 16.	Compostos presentes na F4 de <i>P.hebetatum</i> , massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas.....	70
Tabela 17.	Compostos presentes na F5 de <i>P.hebetatum</i> , massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas.....	71

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Protium hebetatum</i> D. C. Daly.....	21
Figura 2. <i>Protium heptaphyllum</i> March.....	23
Figura 3. Estruturas químicas dos principais fitocompostos identificados no gênero <i>Protium</i> .....	27
Figura 4. Reação de oxirredução da resazurina.....	34
Figura 5. Reação de oxirredução do TTC. ....	35
Figura 6. Fluxograma ilustrativo da metodologia empregada no estudo. ....	37
Figura 7. Esquema da preparação do material vegetal.....	38
Figura 8. Esquema da extração por maceração.....	39
Figura 9. Partição do extrato metanol dos galhos de <i>P. hebetatum</i> .....	40
Figura 10. Cromatografia em camada delgada .....	41
Figura 11. Etapas do fracionamento da PDCM em coluna cromatográfica .....	42
Figura 12. Isolamento de substâncias ativas por CCDP. A área demarcada indica a região que foi comparada, cortada e extraída para identificação.....	43
Figura 13. Cromatógrafo a gás Agilent modelo HP-6890 equipado com um detetor seletivo de massas Agilent modelo HP-5975 utilizado no trabalho. ....	44
Figura 14. Esquema da metodologia Difusão em Ágar .....	46
Figura 15. Esquema da metodologia para determinação a CIM. ....	48
Figura 16. Esquema do método bioautográfico.....	49
Figura 17- Prospecção fitoquímica de folhas e galhos de <i>P. hebetatum</i> .....	51
Figura 18. Análise da partição diclorometano no teste de difusão em poço. ....	54
Figura 19. Análise cromatográfica da fração diclorometano.....	55
Figura 20. Análise em CCD do perfil químico das frações mais ativas.. ....	58
Figura 21. Agentes antibacterianos de F1 identificados pelo método de Bioautografia.....	59

Figura 22. Análise por CCD da F1 e das amostras B1 e B2. Revelador: Anisaldeído. Eluente: Hex: AcOEt 50:50.....	60
Figura 23. Cromatograma da F1 de <i>P. hebetatum</i> .....	61
Figura 24. Espectro de massas da escopoletina com $t_R$ 19,48min da F1 de <i>P. hebetatum</i> .....	61
Figura 25. Cromatograma de B1 obtida de F1 por CCDC.....	62
Figura 26. Cromatograma de B2 obtida de F1 por CCDC.....	63
Figura 27. Espectro de massas da substância ativa $\alpha$ -amirina.....	64
Figura 28. Espectro de massas da substância ativa $\beta$ -amirina.....	64
Figura 29. Espectro de massas da substância ativa Piperonal.....	65
Figura 30. Espectro de massas da substância ativa Estigmasterol.....	65
Figura 31. Cromatograma da FDCM de <i>P. hebetatum</i> .....	66
Figura 32. Cromatograma da F2 de <i>P. hebetatum</i> .....	67
Figura 33. Cromatograma da F3 de <i>P. hebetatum</i> .....	68
Figura 34. Cromatograma da F4 de <i>P. hebetatum</i> .....	69
Figura 35. Cromatograma da F5 de <i>P. hebetatum</i> .....	70
Figura 37. Fragmentograma do composto Escopoletina.....	833
Figura 38. Fragmentograma do composto Piperonal.....	833
Figura 39. Fragmentograma do composto Isoeugenol.....	833
Figura 40. Fragmentograma do composto Metoxieugenol.....	833
Figura 41. Fragmentograma do composto Espatuleno.....	844
Figura 42. Fragmentograma do composto Coumarana.....	844
Figura 43. Fragmentograma do composto p-Vinilguaiacol.....	844
Figura 44. Fragmentograma do composto $\beta$ -Hidroxipropiovanillone.....	844
Figura 45. Fragmentograma do composto Escoparona.....	855
Figura 46. Fragmentograma do composto o- Guaiacol.....	855
Figura 47. Fragmentograma do composto 2,6-Dimethoxyphenol (seringol).....	855
Figura 48. Fragmentograma do composto Antiarol.....	855

Figura 49. Fragmentograma do composto $\alpha$ -amirina .....	866
Figura 50. Fragmentograma do composto $\beta$ -amirina .....	866
Figura 51. Fragmentograma do composto Estigmasterol.....	866
Figura 52. Fragmentograma do composto Ácido benzoico .....	866
Figura 53. Fragmentograma do composto Hexadecanoato de metila.....	877
Figura 54. Fragmentograma do composto 9,12-octadecadienóico de metila.....	877
Figura 55. Fragmentograma do composto Ácido esteárico de metila .....	877

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>22</b>
2.1 GÊNERO <i>Protium</i> Burm. F. DA FAMÍLIA BURSERACEAE Kunth .....	22
2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GÊNERO <i>Protium</i> Burm. F .....	24
2.3 INFECÇÃO BACTERIANA E MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO PARA O SEU CONTROLE.....	29
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
3.1 GERAL.....	36
3.2 ESPECÍFICOS.....	36
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>37</b>
4.1. DIRECIONAMENTO DO ESTUDO FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS.....	37
4.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	37
4.3. PREPARAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA VEGETAL .....	38
4.4. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	39
4.5. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA .....	39
4.6. FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO DOS GALHOS DE <i>P.</i> <i>hebetatum</i> .....	40
4.6.1. PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	40
4.6.2. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	41
4.6.3 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ATIVA POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA .....	41
4.6.4. ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS ATIVAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PREPARATIVA (CCDP).....	43
4.7. IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS.....	44
4.8. TRIAGEM BIOLÓGICA DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS.....	45
4.8.1. ENSAIOS ANTIMICROBIANOS.....	45
4.8.2. PADRONIZAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA.....	45
4.8.3. ENSAIO ANTIBACTERIANO QUALITATIVO / DIFUSÃO EM ÁGAR .....	45
4.8.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)/ DILUIÇÃO EM POÇO .....	47

4.8.5. BIOAUTOGRAFIA DIRETA.....	48
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>
<b>7. APÊNDICES .....</b>	<b>83</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O contínuo aparecimento de novos mecanismos de resistência bacteriana a antimicrobianos tem gerado uma corrida das indústrias farmacêuticas para a produção e lançamento de novos compostos com ação antimicrobiana (JOANA et al., 2013). Essa resistência pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como resposta da bactéria frente ao uso extensivo e muitas vezes inapropriado dos antibióticos e sua presença no meio ambiente. As bactérias multiplicam-se rapidamente, sofrem mutação e são promíscuas, podendo trocar material genético entre linhagens de mesma espécie ou de espécies diferentes (WOODFORD, 2005). Más condições de higiene, fluxo contínuo de viajantes, o aumento de pacientes imunocomprometidos e a demora no diagnóstico das infecções bacterianas também têm favorecido o aumento da resistência (NUSSBAUM et al., 2006).

Algumas estratégias podem ser adotadas para evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana, tais como, prevenção de infecções bacterianas com o uso de vacinas, uso racional de antibióticos, controle e prevenção da disseminação de micro-organismos resistentes e principalmente a descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos (DZIDIC et al., 2008).

Diversas razões justificam a necessidade urgente por novos agentes antibióticos: as doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortalidade do mundo; altas taxas de resistência microbiana, em ambientes hospitalares; o decréscimo constante observado no número total de novos agentes antimicrobianos aprovados pelo Food and Drug Administration - FDA (LUZHETSKYY et al., 2007) e a necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes aos fármacos em uso (COATES & HU, 2007).

Antibióticos naturais geralmente apresentam estruturas químicas complexas importantes para as interações específicas e reconhecimento por alvos macromoleculares em bactérias patogênicas (GUIMARÃES et al., 2010). Neste contexto, nos últimos dez anos os pesquisadores têm voltado atenção para fontes naturais ainda pouco exploradas (CLARDY & WALSH, 2004).

As plantas são consideradas uma fonte importante na descoberta de novos antibióticos, pois é sabido que elas são capazes de biossintetizar compostos

antimicrobianos para prevenir e/ou combater o ataque de micro-organismos patogênicos às plantas. Produtos naturais vegetais também têm sido apontados como inibidores de bombas de efluxo, conhecidas como “bombas de resistência a múltiplos fármacos”, um novo alvo na busca de antibióticos (GUIMARÃES, 2010). Apesar disso, os dados científicos demonstram que somente uma pequena porcentagem das plantas foi estudada quanto ao seu potencial medicinal (JOANA et al., 2013).

O gênero *Protium* é o maior e mais heterogêneo da família Burseraceae, ocorrendo predominantemente em florestas neotropicais. Mais de 80% das espécies de Burseraceae na região Amazônica pertencem a este gênero (SIANI et al., 2004). Suas óleo-resinas são popularmente conhecidas como breus, almécega do Brasil e goma-limão (BANDEIRA et al., 2002) e são utilizadas na medicina popular como tônico, estimulante, anti-inflamatório, analgésico, antitussígeno, antiúlcera e anti-hemorrágico (SIANI et al., 1999). Outras aplicações incluem a produção de incensos ou seu uso como repelente de insetos (CORRÊA, 1973). *Protium hebetatum* D. C. Daly (Figura 1) é uma espécie arbórea encontrada principalmente no norte do Brasil, no Peru e na Venezuela, em matas de terra firme. Um estudo anterior mostrou que a espécie é rica em composto triterpenoides, (COSTA et al., 2012), até então seu potencial farmacológico permanecia desconhecido.

Assim, considerando a urgência na busca de novas drogas para o tratamento de infecções bacterianas e o reconhecido potencial antibacteriano de vários extratos vegetais, esse projeto realizou um estudo fitoquímico biomonitorado por atividade antibacteriana, frente a bactérias de interesse médico, de extratos e frações obtidos das folhas e galhos da espécie *Protium hebetatum*, visando identificar e/ou isolar substâncias com atividade antibacteriana, com vistas a oferecer alternativas ao arsenal terapêutico atual.



Figura 1. *Protium hebetatum* D. C. Daly.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 GÊNERO *Protium* Burm. F. DA FAMÍLIA BURSERACEAE Kunth

A família Burseraceae, pertencente à ordem Rutales, é distribuída em 16 gêneros encontrados nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo dividida em três tribos: *Protieae*, *Boswellieae*, *Canarieae*. A tribo *Protieae* abrange três gêneros, incluindo o mais representativo da família, o gênero *Protium* Burm. F., que possui cerca de 146 espécies (SIANI et al., 2004).

Na Amazônia encontra-se o maior número de espécies de *Protium*, que totalizam 73, sendo 42 endêmicas, o que representa uma concentração com mais de 60% de todas as espécies (DALY, 1987). Além da grande diversidade, o gênero constantemente aparece entre as espécies de maior importância ecológica por sua abundância e distribuição (AMARAL et al., 2000). Em inventários realizados no Estado do Amazonas (Brasil) foram encontrados entre 41 a 89 indivíduos por hectare, sendo a grande maioria pertencente ao gênero *Protium*. As três espécies com maior número de indivíduos, foram *Protium hebetatum*, *Protium apiculatum* e *Protium strumosum* (CARNEIRO, 2004; OLIVEIRA e AMARAL, 2004; DINIZ e SCUDELLER, 2005).

Espécies da família Burseraceae são caracterizadas por exsudar resinas, que se encontram armazenadas em dutos ou cavidades. Quase sempre apresentam traços de látex branco resinoso tanto em seus ramos, como dispersos em forma de gotículas em talhos feitos na casca. Ferimentos nos troncos são caracterizados pelo esbranquiçamento, devido à rápida secagem da resina aromática. O fluxo natural da resina é obtido também pela ação de insetos e uma escala de produção comercial pode ser eventualmente induzida por meios químicos (SIANI et al., 2004).

Essas resinas são bastante utilizadas na indústria de verniz, calafetagem de embarcações e outros objetos de madeira (BANDEIRA et al., 2002; MAIA et al., 2000), em rituais místicos na forma de incenso, sendo muito usada em cerimônias religiosas para a defumação de ambientes (VARGHESE & TICKTIN, 2008). Os índios Tembé e Kaapor, ambos da etnia Tupi-Guaraní, localizados na Amazônia Oriental, têm na colheita da resina um de seus principais produtos econômicos (BALÉE, 1987; PLOWDEN, 2001).

O mercado internacional também é muito receptivo a este tipo de resina, que são aplicadas como fixadores de tintas artísticas e também na fabricação de cosméticos, produtos de higiene e de perfumaria (RAMOS et al., 2000). Em mercados da região Amazônica, resinas de *Protium sp.* são comercializadas com diversos propósitos e são conhecidas popularmente como “breus” (RAMOS et al., 2000). Na medicina popular, são utilizadas como anti-inflamatórios, analgésicos, expectorantes, cicatrizantes e como repelente de insetos (BANDEIRA et al., 2002; CORRÊA, 1973; MAIA et al., 2000).

Baseados nesse uso medicinal, Otuki et al (2005) obtiveram excelentes resultados estudando o potencial do extrato éter etílico da resina de *Protium kleinii* como anti-inflamatório de uso tópico. Estudos farmacológicos com os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina isolados a partir de extratos das folhas e resina da espécie *Protium heptaphyllum* (Figura 2) demonstraram atividade analgésica, anti-inflamatória, antidepressiva, sedativa, gastroprotetora e citotóxica (SUSUNAGA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2004; HOLANDA PINTO et al., 2008; ARAGÃO et al., 2007; TAYLOR et al., 2012). Em outro estudo realizado por Deharo et al. (2001) foi verificado que a resina de *Protium glabrescens* apresenta uma potente atividade antimalárica. Por sua vez, o estudo de Santana et al. (2009) apontou que o óleo essencial extraído das folhas de *Protium confusum* apresenta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis*.



Figura 2. *Protium heptaphyllum* March. (A) Espécime em seu *habitat*; (B) Resina exsudada no tronco.  
Fonte: [http://www.ulf-mehlig.de/jpg/dunes/du\\_protium-1-0.html](http://www.ulf-mehlig.de/jpg/dunes/du_protium-1-0.html)

## 2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GÊNERO *Protium* Burm. F.

Os principais grupos de compostos possuidores de propriedades antimicrobianas extraídos de plantas incluem os terpenóides, alcalóides, lectinas, polipeptídeos e as substâncias fenólicas, incluindo fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis, taninos e cumarinas (SIMÕES et al., 2007; RESCHKE et al., 2007). Essa variedade de compostos é responsável pelo interesse de pesquisas com plantas para a produção de novos antimicrobianos (GUIMARÃES, 2010). Compostos ativos encontrados em algumas plantas possuem ação antisséptica como, por exemplo, o timol e carvacrol, o eugenol e isoeugenol e o 4-terpinenol, mostrando que os terpenos têm maior poder antibacteriano que outros compostos (COLOMBA et al., 2011).

A partir do extrato éter etílico de casca de *Protium paniculatum* foram identificados através de análise por cromatografia gasosa acoplada em espectrômetro de massas (CG-EM), os triterpenoides  $\alpha$  e  $\beta$  amirina, o  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e o ácido elágico (ZOGBHI. et al., 1993).

Siani et al. (2004) pesquisando os constituintes voláteis da resina, frutos e folhas da espécie *Protium icicariba*, encontraram predominantemente monoterpenos no óleo extraído da resina, enquanto que na amostra de óleo extraída da folha houve a prevalência de sesquiterpenos.

Estudando *Protium heptaphyllum*, Citó et al. (2006) identificaram por CG-EM dez substâncias no óleo essencial das folhas, sendo o trans- $\beta$ -ocimeno (15,74%),  $\beta$ -cariofileno (32,08%), ledeno (14,58%) e germacreno-B (16,71%) os componentes majoritários. A análise do óleo essencial dos frutos possibilitou identificar oito substâncias, no qual o limoneno,  $\alpha$ -pineno e  $\alpha$ -3-careno foram os componentes principais.

Silva (2006) estudou os óleos essenciais extraídos de quatro espécies de *Protium*, sendo elas, *Protium divarictium*, *Protium amazonicum*, *Protium hebetatum* e *Protium nitidifolium*. Dentre os constituintes majoritários comuns das quatro espécies encontram-se os monoterpenos  $\alpha$ -pineno, limoneno, o-cimeno, 4-terpin-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, cis-pinano e os sesquiterpenos  $\beta$ -elemeno, z- e e-cariofileno, cedrano,  $\gamma$ -muuroleno e cis-diidro acetato de acidentalol.

Silva et al. (2009) estudaram extratos hexano provenientes de oleorresinas de sete espécies de *Protium*. Esses extratos foram analisados por cromatografia

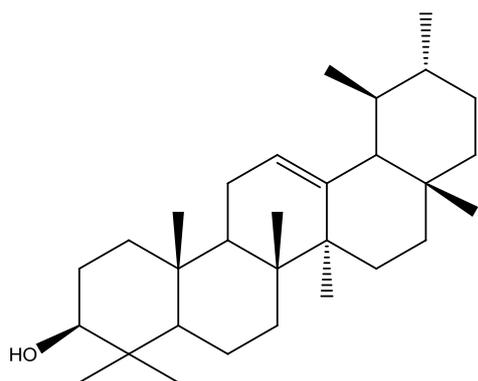
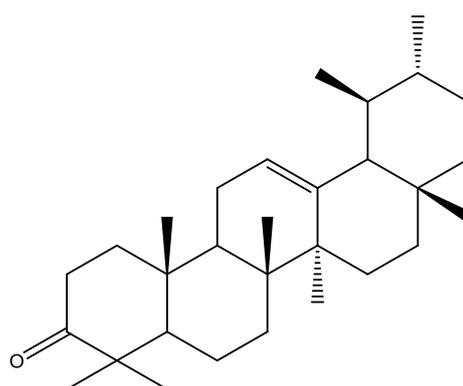
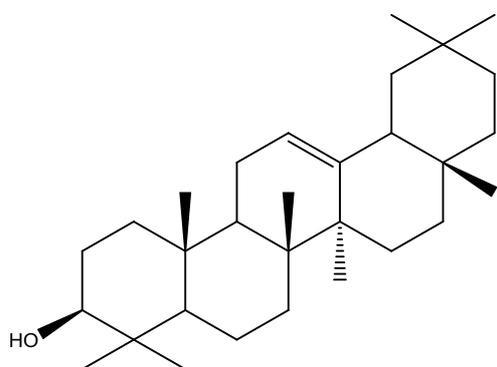
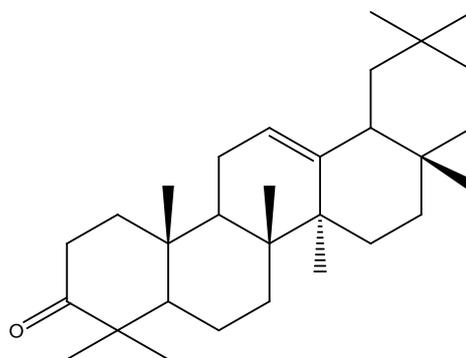
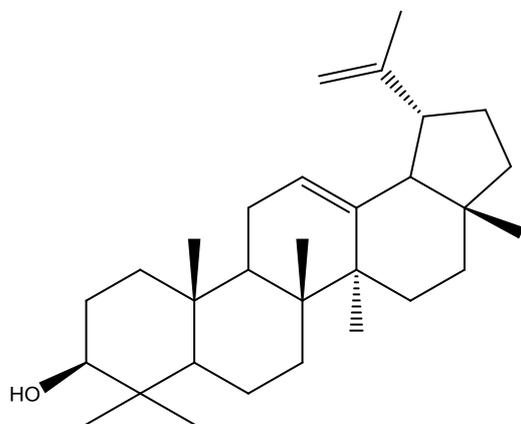
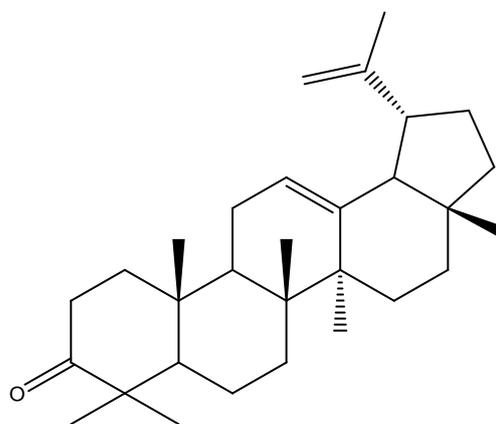
gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada em espectrometro de massas CG-EM. Um total de 38 compostos foram identificados nestes extratos, sendo os principais,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, p-cimeno,  $\alpha$ -cubebene,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -amirinona,  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina. O p-cimeno foi o monoterpene principal de *Protium grandifolium* (46,5%) e *Protium apiculatum* (25,4%). Altas concentrações de  $\alpha$ -e  $\beta$ -amirina foram detectadas em *Protium strumosum* (64%) e em *Protium tenuifolium* (66,7%).

Outro estudo fitoquímico sobre as óleo-resinas foi feito por Díaz et al. (2011) e caracterizou quatro espécies de *Protium*: *P. grandifolium*, *P. hebetatum*, *P. paniculatum* e *P. subserratum*. Em *P. paniculatum* foram encontrados os triterpenos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina; em *Protium grandifolium*, os triterpenos lupenona,  $\alpha$ -amirinona, lupeol e  $\alpha$ -amirina; em *P. hebetatum*, os triterpenos lupenona,  $\alpha$ -amirinona,  $\beta$ -amirinona, lupeol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina; por fim, na espécie *P. subserratum*, foram identificados os triterpenos lupenona,  $\alpha$ -amirinona,  $\beta$ -amirinona, lupeol,  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina.

A composição química dos óleos essenciais de *Protium giganteum* e *Protium aracouchine* também foi determinada por meio de análise por GC-MS. Entre os compostos identificados no óleo de *P. giganteum*, 93,6% eram sesquiterpenos, sendo  $\beta$ -cariofileno, globulol,  $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -humuleno e germacreno, os componentes principais. Dos compostos identificados no óleo de *P. aracouchine*, 95,9% também eram sesquiterpenos, tendo como componentes principais o espatulenol,  $\alpha$ -cis-bergamoteno e viridiflorol (FREITAS et al., 2011).

Costa et al. (2012) isolaram e identificaram uma mistura de dois terpenoídes ( $\alpha$  e  $\beta$ -amirina), três esteroides (campesterol, estigmasterol e sitosterol) e uma cumarina (escopoletina) em extratos orgânicos provenientes do caule de *Protium hebetatum*.

De forma geral, foram realizados poucos estudos químicos com o gênero *Protium*, sendo que a maioria desses estudos investiga principalmente os óleos essenciais extraídos da resina. Essas pesquisas revelaram que os triterpenos pentacíclicos, os esteroides e as cumarinas são os constituintes de maior potencial farmacológico do gênero (Figura 03).

 **$\alpha$ -amirina** **$\alpha$ -amirinona** **$\beta$ -amirina** **$\beta$ -amirinona****Lupeol****Lupenona**

(continua na próxima página)

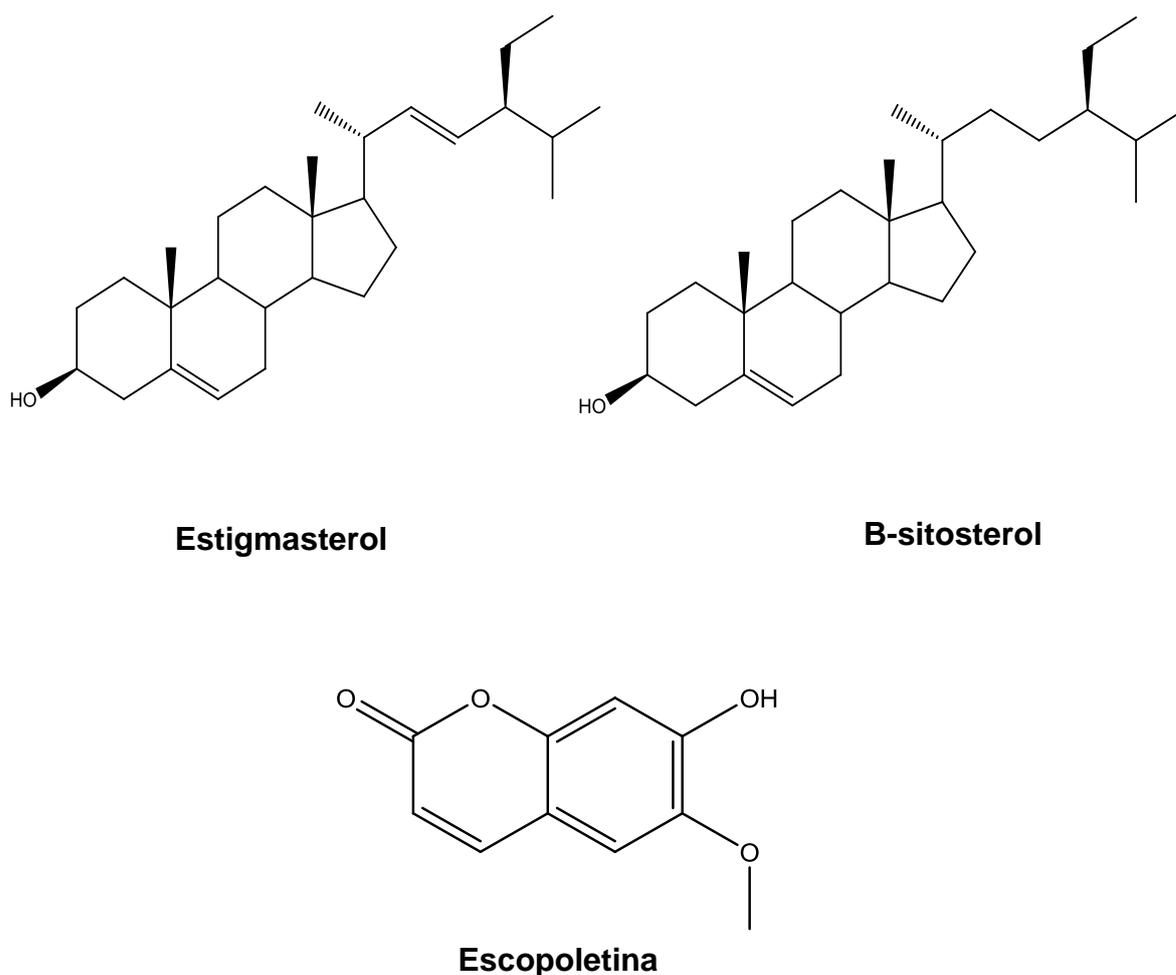


Figura 3. Estruturas químicas dos principais fitocompostos identificados no gênero *Protium*.

Os triterpenos pentacíclicos são constituintes que têm despertado um grande interesse nos últimos anos em razão da comprovação de inúmeras atividades terapêuticas, tais como: antitumoral, anti-inflamatória, analgésica, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antidiurético, hepatoprotetora, neuprotetora, antioxidante, giardicida e inibidores da enzima acetilcolinesterase (MAHATO & SEN, 1997; BARBOSA-FILHO et al., 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2007; COLOMA et al., 2011).

Outra importante função apresentada por triterpenos pentacíclicos está relacionada com o tratamento da Diabetes Tipo 2. Estudos têm revelado que triterpenos têm atuado como inibidores da enzima glicogênio fosforilase, diminuindo os níveis de glucose no sangue. Dentre esses compostos, estão o ácido oleanólico, ácido maslínico e seus derivados, ácido arjunólico e ácido corosólico. Essa inibição

tem feito desses compostos alvos terapêuticos promissores para o tratamento de doenças causadas por anomalias no metabolismo do glicogênio (LIANG et al., 2011).

Além das propriedades medicinais relatadas para os triterpenos, o campo da nanociência e química supramolecular tem demonstrado grande interesse nessas moléculas. O triterpeno pentacíclico triidroxilado do tipo oleanano, conhecido como ácido arjunólico, bem como seus derivados alquílicos e arílicos tem sido alvo de estudos nessa área. A propriedade desses compostos de gelificar quando em contato com solventes orgânicos em baixa concentração tem aberto a possibilidade de empregá-los em diversas áreas, tais como, fotografia, indústria alimentícia, cosméticos, hidrometalurgia, indústria de lubrificantes e na indústria farmacêutica, como adjuvantes para a liberação prolongada de fármacos (SETH et al., 2011).

Os esteroides são constituintes que também apresentam inúmeras atividades biológicas. Um exemplo emblemático é a síntese de hormônios como a progesterona a partir de saponinas isoladas de uma planta do altiplano mexicano, conhecida como “*cabeza de negro*” (*Dioscorea macrostachya* Benth.), que contribuiu significativamente para o desenvolvimento da pílula contraceptiva feminina (SIMÕES, 2007).

Outros benefícios dos esteroides incluem a proteção contra doenças cardiovasculares devido ao seu efeito na redução do colesterol, estresse oxidativo e redução da inflamação através da inibição da produção excessiva de cortisol e na prevenção do câncer, por alteração da transferência de nutrientes essenciais para o crescimento do tumor (ACEDO et al., 2012).

Outro grupo de metabólitos secundários de interesse farmacológico encontrados em espécies do gênero *Protium* são as cumarinas, possuem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anticoagulantes, antibióticas, imunomodulatórias, antimicrobianas, antiviral e broncodilatadoras, sendo assim amplamente aplicadas na medicina no tratamento de linfedemas, câncer, queimaduras, varizes e doenças reumáticas (GUDASI et al., 2008; JUNG e PARK, 2009).

Na indústria alimentícia, as cumarinas são utilizadas como corantes e essências, e em bebidas alcoólicas. Na indústria de cosméticos, como fixador de perfumes. As cumarinas também apresentam diversas aplicações em diferentes áreas, sendo encontradas em borrachas sintéticas, materiais plásticos, inseticidas,

detergentes, cigarros, tintas e sprays (JACQUEMIN et al., 2009; PAGONA et al., 2011).

Mais recentemente, os compostos cumarínicos e seus derivados têm despertado o interesse de um grande número de grupos de pesquisa, na área de novos materiais, pela possibilidade de seu uso como corantes sensibilizadores em células solares (DSSC) e lasers. As cumarinas absorvem fortemente na região do visível e possuem um elevado rendimento quântico de fluorescência, por isso elas têm grande possibilidade de serem bons sensibilizadores para semicondutores (LIU et al., 2012; TAKIZAWA et al., 2012).

Na área de medicamentos, destacam-se os derivados da 4-hidroxi-cumarina, descobertos durante a investigação de uma doença hemorrágica no gado alimentado com trevo-de-cheiro-amarelo fermentado, o que levou à descoberta da ação anticoagulante do dicumarol. Esse foi o primeiro fármaco a apresentar essa ação quando administrado pela via oral, e constituiu o modelo para o desenvolvimento de uma classe de anticoagulantes com o núcleo básico de 4-hidroxi-cumarina, do qual derivam importantes fármacos como a varfarina (SIMÕES, 2007).

A escopoletina, cumarina já identificada no gênero *Protium* (figura 03), é utilizada em medicamentos que atuam na regulação da pressão arterial. Além disso, possui inúmeras atividades biológicas relatadas na literatura, como antioxidante, inibidor da enzima acetilcolinesterase, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antiespasmódica, antitumoral, anti-artrítica e é utilizada também no tratamento de hipertrigliceridemia (MUSA et al. 2008; SASAKI, 2008).

### 2.3 INFECÇÃO BACTERIANA E MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO PARA O SEU CONTROLE

As bactérias são células procarióticas desprovidas de núcleo e retículo endoplasmático, e que sintetizam seu próprio DNA, RNA e proteínas (COTRAN et al., 2000). A parede celular da maioria das bactérias é composta por uma substância somente encontrada nos procariotos, o peptidoglicano, que dá rigidez às células (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

A parede celular de Gram-negativas é uma estrutura em multicamadas bastante complexa composta por uma membrana externa de dupla camada lipídica: uma interna, formada por fosfolipídios, que se assemelha a estrutura da membrana plasmática humana e uma externa, contendo lipopolissacarídeos e proteínas. Já as bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular muito mais espessa, com várias camadas de peptidoglicano, porosa o suficiente para permitir a difusão de metabólitos para a membrana plasmática, e espessa o suficiente para impedir a passagem de substâncias hidrofóbicas pela presença de açúcares e aminoácidos (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; SCHAECHTER et al., 2009).

Os principais mecanismos de ação dos fármacos antimicrobianos são: inibição da síntese de RNA; bloqueio da replicação e reparo do DNA, inibição da formação de ligação cruzada entre cadeias de peptidoglicano, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana; inibição da síntese proteica bacteriana e afetar a permeabilidade da membrana bacteriana por facilitarem o movimento descontrolado de íons através da membrana (WALSH, 2003). No entanto, tendo em vista as características das células bacterianas, entre elas a rápida capacidade de colonização e desenvolvimento de resistência às drogas antibacterianas disponíveis, as infecções causadas por bactérias foram e ainda são uma importante causa de morte no mundo (OLAECHEA et al., 2010). No Brasil, apesar de não existir um sistema ideal de rastreamento, as infecções hospitalares de origem bacteriana são consideradas um problema de saúde pública visto que o uso de antimicrobianos de modo indiscriminado e inapropriado aumenta o risco de desenvolvimento de mecanismo de resistência nesses micro-organismos (TENOVER, 2006) e tornam os tratamentos das doenças infecciosas mais difíceis, aumentando a morbidade e mortalidade (PITTET, 2005).

Pesquisa realizada por Sader et al. (2001), mostrou que os patógenos mais frequentemente isolados em alguns hospitais brasileiros foram *Staphylococcus aureus* (22,8%), seguidos pela *Escherichia coli* (13,8%) e a *Pseudomonas aeruginosa* (13,3%). Dessa forma, são descritas a seguir as principais características dessas bactérias de importância médica, assim como as demais bactérias testadas neste estudo.

- *Staphylococcus aureus*

São cocos Gram-positivos que apresentam elevada incidência, tanto na comunidade quanto no ambiente hospitalar, sendo que um dos mecanismos de resistência predominante nesta espécie é a produção de beta-lactamases, principalmente penicilinases, nos quais os principais alvos de degradações por estas enzimas são os fármacos amoxicilina e meticilina. Colonizam naturalmente a pele, as mucosas e o trato respiratório superior. A infecção por *S. aureus* ocorre quando este patógeno encontra uma porta de entrada, pele e mucosas não íntegras, secretando enzimas e toxinas lesivas às membranas, capazes de destruir as células de defesa do corpo (RUBIN e FARBER, 1999; SANTOS, 2007). Esta bactéria é responsável por diversas infecções, tais como epiteliais, osteomelite, pneumonia, septicemia, bacteremia, miocardite e síndrome do choque tóxico, geralmente está associada a várias doenças, incluindo enfermidades sistêmicas potencialmente fatais, infecções oportunistas e intoxicação alimentar (IWATSUKI et al., 2006).

- *Pseudomonas aeruginosa*

É um bacilo Gram-negativo aeróbio, tipicamente causador de infecções hospitalares, urinárias e septicemias, sendo os pacientes com queimaduras, cateterismo vesical, fibrose cística, diabetes e neutropenia, os mais susceptíveis (THOMSON e BONOMO, 2005; MARRA et al., 2006). Uma das características mais destacadas desta espécie é a capacidade de produzir um pigmento azul-esverdeado, denominado piocianina (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

- *Escherichia coli*

É um bastonete Gram-negativo, aeróbico, que habitam o trato intestinal de humanos e animais, apresentando diversos sorotipos e diferentes fatores de virulência. Cada sorotipo é capaz de causar diferentes infecções entéricas, urinárias e hospitalares (MARRA et al., 2006).

- *Enterococcus faecalis*

São cocos Gram-positivos, aneróbios facultativos, residentes do trato gastrointestinal, trato genital feminino e da cavidade bucal como comensais. Esses micro-organismos podem agir como patógenos oportunistas causando infecções severas no trato urinário, bacteremia e endocardite bacteriana (WECKWERTH et al., 2013).

- *Klebsiella pneumoniae*

É um bacilo Gram-negativo, encapsulado, anaeróbio facultativo. É conhecida como superbactéria, por expressar resistência a até 95% dos antimicrobianos existentes no mercado farmacêutico. Esse micro-organismo pode causar pneumonia, mas a maioria das infecções associadas ocorre em pacientes imunodeprimidos hospitalizados e/ou com dispositivos invasivos como cateter, sonda, pulsão venosa periférica (MOON et al., 2013).

- *Salmonella enterica*

É um bacilo Gram-negativo, apresenta mais de 2.000 sorotipos diferentes, sendo os mais conhecidos, Typhi, Paratyphi, Enterditi, Typhimurium e Choleraesuis. Esses micro-organismos são responsáveis por causar infecção alimentar que atinge cerca de 1,3 milhões de pessoas por ano, além de causar febre tifóide ao invadir o trato gastrointestinal. Devido à semelhança com a bactéria *E. coli*, muitos estudos relacionados a estrutura genômica e compreensão atual de funções celulares e moleculares das células estão sendo realizadas com a *S. enterica* (.BENOIT et al., 2013)

Uma grande variedade de métodos pode ser empregada para medir a atividade *in vitro* de potenciais agentes antimicrobianos (SILVEIRA et al., 2009). Os métodos de difusão em ágar e diluição em caldo são os mais utilizados na rotina dos laboratórios por serem consideradas técnicas de fácil execução e alta reprodutibilidade (CLSI, 2009). Também merece destaque o método bioautográfico, uma técnica qualitativa útil para determinar os compostos bioativos responsáveis

pela atividade antibacteriana apresentada pelos extratos e frações (CHOMA & GRZELAK, 2011).

O teste de difusão em ágar é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido, e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância testada (PINTO et al., 2003). A aplicação do método de difusão se limita a microrganismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de micro-organismos. A atividade antibacteriana é determinada pela mensuração do halo de inibição e analisada como mostra na tabela 01 (ALVES, 2000).

Tabela 1. Critério de categorização da atividade antibacteriana

Halo (mm)	Nível de atividade
< 9 mm	Inativo
9 – 12 mm	Pouco ativo
13– 18 mm	Ativo
>18 mm	Muito ativo

Outra técnica amplamente utilizada é a microdiluição em caldo. Esta é extremamente vantajosa quando se refere a produtos naturais, pois utiliza quantidades mínimas das drogas em teste. Além disso, é uma técnica de baixo custo, simples, rápida, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, de alto rendimento e o mais importante, permite determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das amostras em estudo (PALOMBO, 2011).

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do micro-organismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância testada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano (PINTO et al., 2003).

O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos micro-organismos. Apesar dessa técnica apresentar

algumas desvantagens, tais como células de alguns micro-organismos que se aderem à base do poço, precipitação de compostos presentes em alguns extratos e a coloração do extrato em concentração alta que podem interferir na análise, ainda é considerada a mais adequada e mais sensível para a avaliação da atividade antibacteriana de novos compostos (OSTROSKY et al., 2008).

O revelador resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) normalmente é utilizado para a análise dos resultados (FUKUSHIMA et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea), como mostrado na figura 4. A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O' BRIEN et al., 2000).

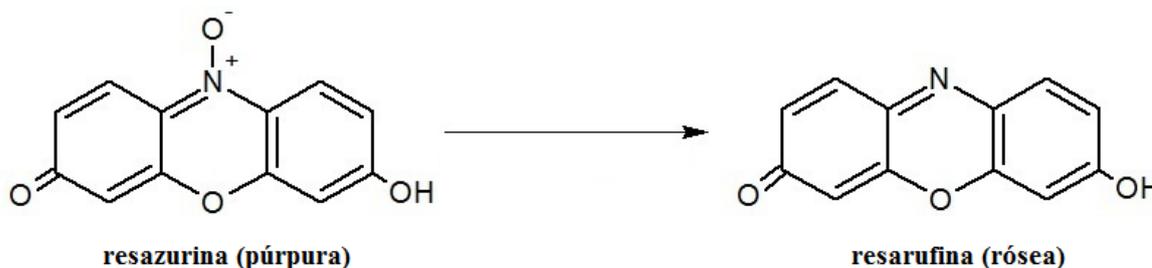


Figura 4. Reação de oxirredução da resazurina.

O método de bioautografia também é considerado simples, barato, rápido, sensível e não requer equipamentos sofisticados. É semelhante ao método de difusão em ágar, entretanto, as amostras testadas são aplicadas em cromatofolhas de sílica gel 60 ou papel, que posteriormente são eluídas em sistemas de solventes previamente ajustados com o objetivo de separar os compostos presentes no extrato.

A cromatofolha é então imersa em uma placa de Petri que posteriormente é coberta com um meio de cultura sólido inoculado com o micro-organismo teste. Quando os compostos apresentam atividade antibacteriana halos de inibição são formados. Para facilitar a visualização desses halos são aplicados os reveladores, sendo normalmente utilizado o revelador cloreto de 2,3,5 – trifeniltetrazólio (TTC). Como resultado, pontos brancos aparecem contra um fundo roxo na superfície da cromatoplaca, apontando a presença dos agentes antibacterianos (CHOMA & GRZELAK, 2011).

O TTC é um indicador de oxirredução utilizado para diferenciar tecidos metabolicamente ativos daqueles não ativos. O mecanismo baseia-se na redução enzimática do 2,3,5 – trifeniltetrazólio (incolor) em 1,3,5 – trifenilformazan (cor avermelhada), como mostrado na figura 5, em tecidos vivos devido à atividade de várias desidrogenases, enzimas importantes na oxidação de compostos orgânicos e portanto no metabolismo celular (GABRIELSON et al., 2002).

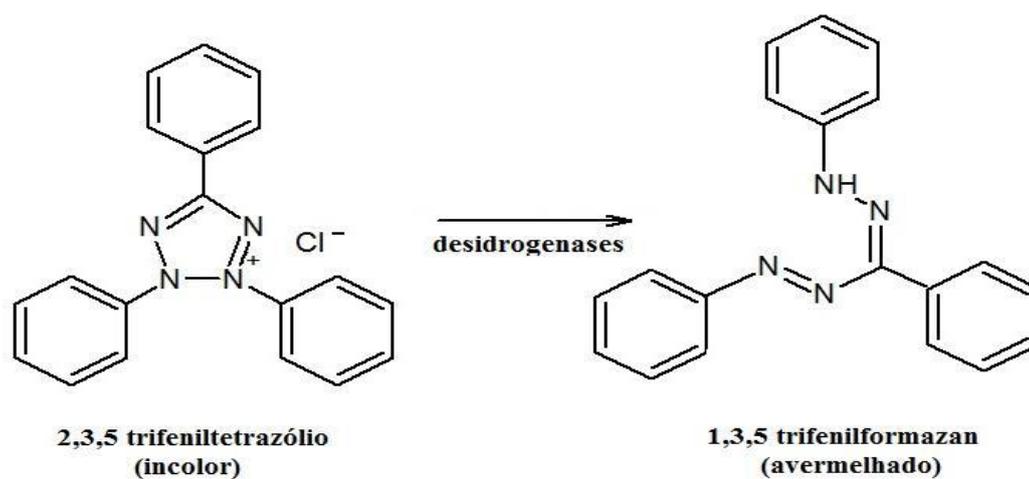


Figura 5. Reação de oxirredução do TTC.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar o potencial antibacteriano de folhas e galhos de *Protium hebetatum* D. C. Daly (Burseraceae) empregando fracionamento fitoquímico biomonitorado.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Investigar a atividade antibacteriana dos extratos hexano, acetato de etila e metanol obtidos de folhas e galhos de *P. hebetatum* frente a bactérias de interesse médico;
- Obter substâncias e/ou frações semipurificadas com atividade antibacteriana a partir dos extratos ativos contra bactérias de interesse médico aplicando técnicas cromatográficas;
- Determinar a concentração inibitória mínima dos extratos, frações e substâncias que apresentarem atividade antibacteriana.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. DIRECIONAMENTO DO ESTUDO FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS

A figura 6 simplifica a metodologia deste estudo. Os testes da seção 4.8 foram empregados na rotina de direcionamento dos fracionamentos fitoquímicos dos extratos orgânicos brutos e frações subsequentes, até a obtenção de substâncias puras ou frações semi-purificadas, biologicamente ativas.

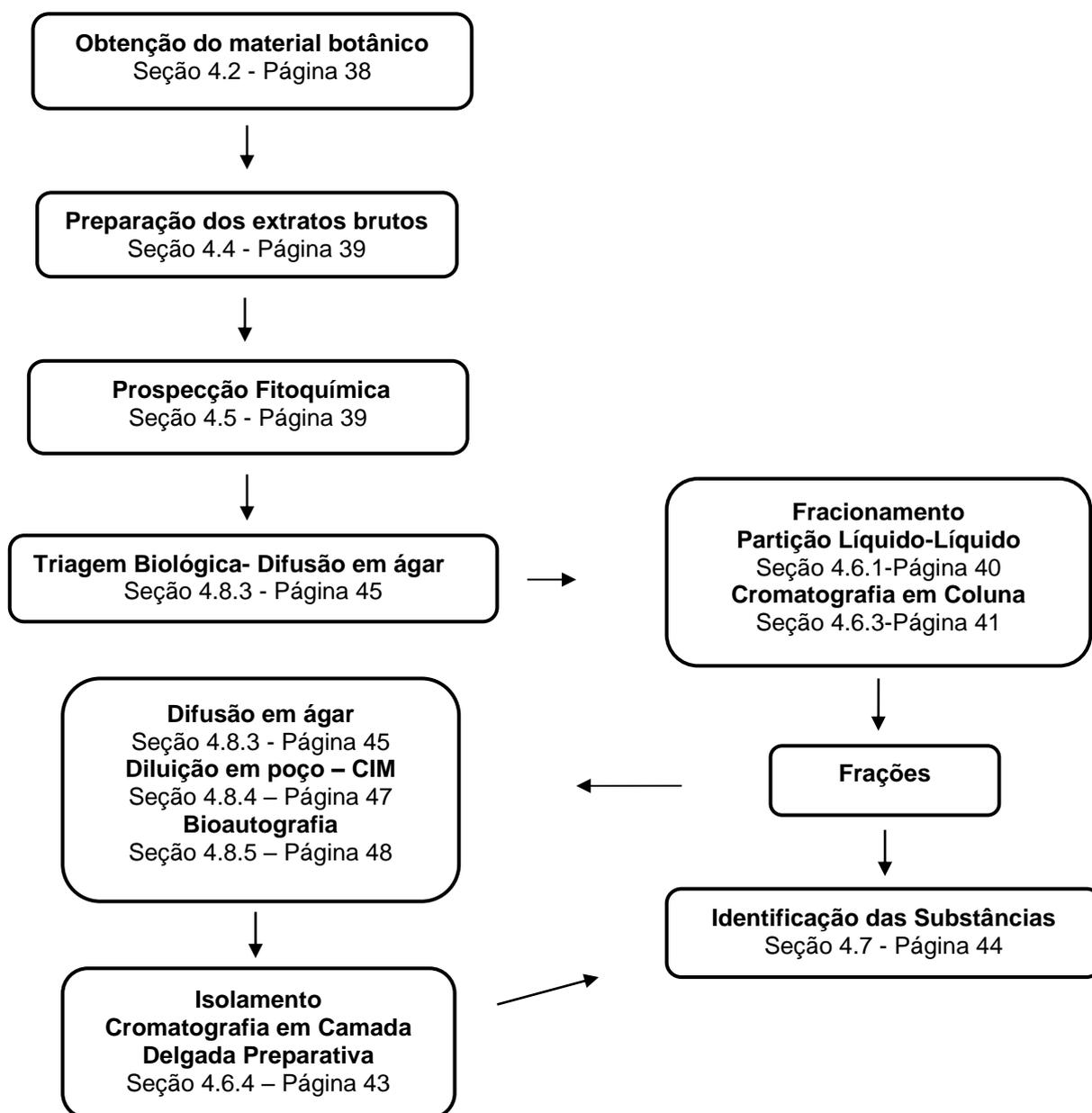


Figura 6. Fluxograma ilustrativo da metodologia empregada no estudo.

## 4.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A coleta de folhas e galhos de *P. hebetatum* foi realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke, pertencente ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localizada a nordeste de Manaus, no Km 26 da Rodovia Manaus-Itacoatiara (AM-010). Com auxílio dos mateiros, as folhas e galhos foram coletadas de 5 indivíduos da espécie *P. hebetatum*. A espécie foi identificada pelo Dr. Mike Hopkins do Herbário do INPA, onde foram depositadas as exsiccatas sob os números 251968, 251969, 251970, 251971 e 251972.

## 4.3. PREPARAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA VEGETAL

Após coletado, o material vegetal foi levado para um armário com tela de proteção onde foi secado em temperatura ambiente durante 7 dias, em seguida foi levado a estufa com circulação de ar à 40° C por 24h para eliminar completamente a água. As folhas e galhos foram moídos em moinhos de facas e conservados à temperatura ambiente e ao abrigo da luz até a extração (Figura 7).

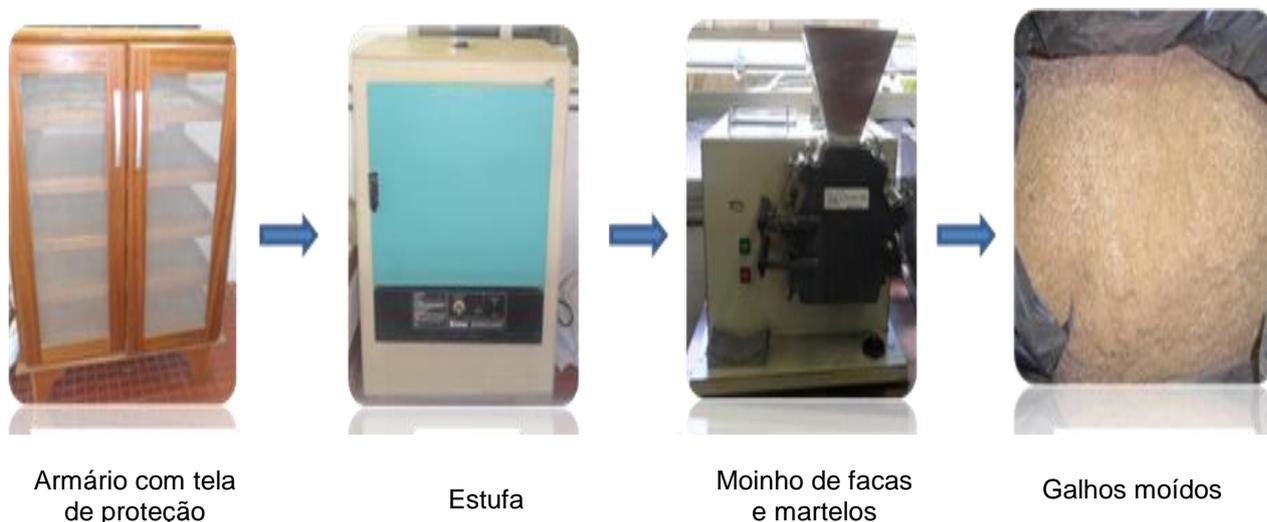


Figura 7. Esquema da preparação do material vegetal.

#### 4.4. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Para a obtenção dos extratos, 480 g de folhas e 638 g de galhos moídos de *P. hebetatum* foram submetidos à extração separadamente pelo método de maceração acoplado ao ultrassom (Ultrasonic Cleaner Unique®) com solventes de polaridade crescente: 7 L de hexano (Hex), 6 L de acetato de etila (AcOEt) e 8 L de metanol (MeOH). A solução obtida foi então filtrada em papel de filtro e os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo (Rotaevaporador IKA® RV10 basic) com pressão de 500 mmHg, à temperatura de 45 °C e 110 rpm (Figura 8). O volume residual do solvente foi evaporado em capela de exaustão, em temperatura ambiente, obtendo-se assim os extratos secos, que foram guardados em recipientes pesados, sob refrigeração (8 °C) até a utilização (SIMÕES et al., 2007).



Figura 8. Esquema da extração por maceração.

#### 4.5. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Para a realização da prospecção fitoquímica, uma solução extrativa hidroetanólica e uma solução extrativa aquosa, produzidas a partir de 20 g do pó das folhas e galhos de *P. hebetatum* foram submetidas a uma série de reações físico-químicas. A partir da solução hidroetanólica realizou-se a prospecção de alcaloides, ácidos orgânicos, fenóis, cumarinas, antraquinonas, esteroides e triterpenos. A partir da solução aquosa realizou-se prospecção de heterosídeos antociânicos,

heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogenéticos, flavonoides, gomas, taninos, mucilagens, aminogrupos e ácidos voláteis. As metodologias utilizadas para a detecção dos metabólitos foram realizadas segundo as metodologias de Matos (1997) e Costa (2001).

#### 4.6. FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO DOS GALHOS DE *P. hebetatum*

##### 4.6.1. PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Devido à atividade antibacteriana apresentada no teste descrito na seção 4.8.3 página 44, o extrato metanol dos galhos foi selecionado para o fracionamento biomonitorado. Nesta primeira etapa, o extrato foi submetido ao processo de partição líquido-líquido. Para tanto, 35 g do extrato metanol foram solubilizadas em 500 mL de uma solução água : metanol na proporção de 8:2, então a solução extrativa foi transferida para um funil de separação onde foi extraída com 400 mL de hexano (Hex), diclorometano (DCM) e acetato de etila (AcOEt), sequencialmente (Figura 9). Após as extrações, a fase residual foi denominada hidrometanólica (Hidro).

Para a eliminação do solvente, as partições foram concentradas em evaporador rotativo (Rotaevaporador IKA® RV10 basic) com pressão de 500 mmHg e o volume residual do solvente foi evaporado em capela de exaustão, em temperatura ambiente. O solvente da fase hidrometanólica foi eliminado via secagem em *spray dryer*. As partições obtidas (PHex, PDCM, PAcOEt e PHidro) foram testadas pelo método difusão em ágar, na concentração de 4 mg/mL, contra as mesmas bactérias usadas nos testes com o extrato metanol bruto.



Figura 9. Partição do extrato metanol dos galhos de *P. hebetatum*.

#### 4.6.2. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada para avaliação qualitativa preliminar dos componentes das frações e para definir os sistemas de eluentes utilizados nos fracionamentos posteriores. Foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel 60 CCM ALUGRAM®Xtra SIL G/UV254 (Figura 10).

Partições e frações foram solubilizadas em solventes de acordo com sua polaridade, e estes foram adicionados em cromatoplasas com o auxílio de microseringas. Em seguida as placas foram colocadas em cubas saturadas contendo a fase móvel a ser testada. Os eluentes utilizados como fase móvel foram definidos de acordo com as características dos compostos presentes, seguido de revelação sob lâmpadas UV 254 nm e UV 360 nm, e com solução de anisaldeído e aquecimento em estufa a 100°C por 10 min.

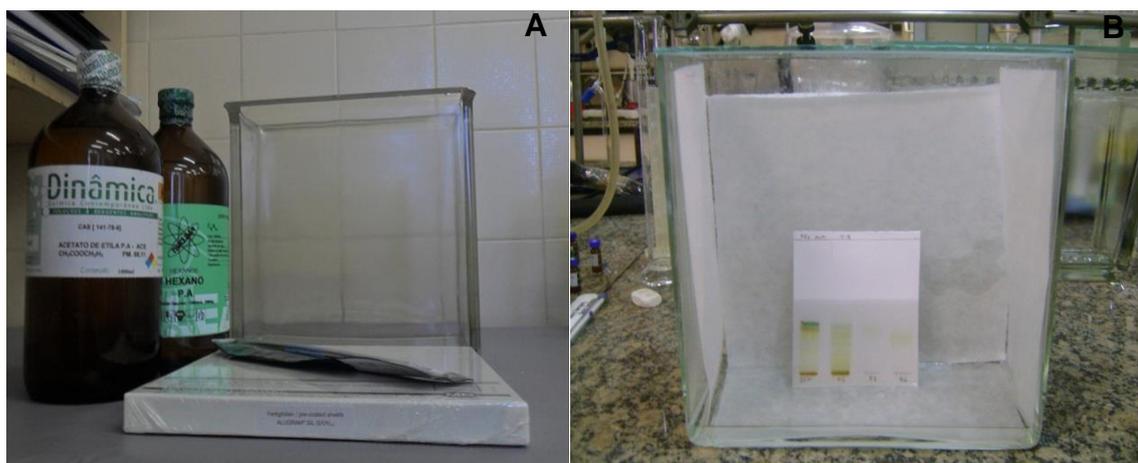


Figura 10. Cromatografia em camada delgada. (A) Materiais utilizados na CCD; (B) Eluição das amostras aplicadas em cromatofolhas de sílica gel 60.

#### 4.6.3 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ATIVA POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Após a análise prévia em CCD, 480 mg da PDCM proveniente do extrato metanólico dos galhos de *P. hebetatum* foram fracionados por cromatografia em coluna. Para tanto, utilizou-se coluna cromatográfica de vidro (32 cm de altura e 2 cm de diâmetro) como suporte e 40,31 g de sílica gel 60 (0,063 - 0,200 MM) (70 - 230 MESH – VETEC) como fase estacionária.

Após empacotamento da coluna e aplicação da amostra, a coluna foi eluída inicialmente com DCM:AcOEt (60:40 v/v), seguido de DCM:AcOEt (50:50 v/v), AcOEt:DCM (70:30 v/v), AcOEt:DCM (90:10 v/v), AcOEt 100%, AcOEt:MeOH (90:10 v/v), AcOEt:MeOH (80:20 v/v), AcOEt:MeOH (70:30 v/v), AcOEt:MeOH (60:40 v/v) e MeOH 100%, fornecendo 36 frações.

Cada fração da coluna foi analisada por CCD utilizando eluentes de acordo com as características dos compostos presentes, seguido de revelação sob lâmpadas UV 254 nm e UV 360 nm e com solução de anisaldeído e aquecimento em chapa a 100 °C por 10 min. As frações semelhantes foram agrupadas resultando o total de 10 frações, identificadas pelo número correspondente à sequência em que foram obtidas (Figura 11), então submetidas a uma nova triagem de testes *in vitro* descritos na seção 4.8.4 na página 46.

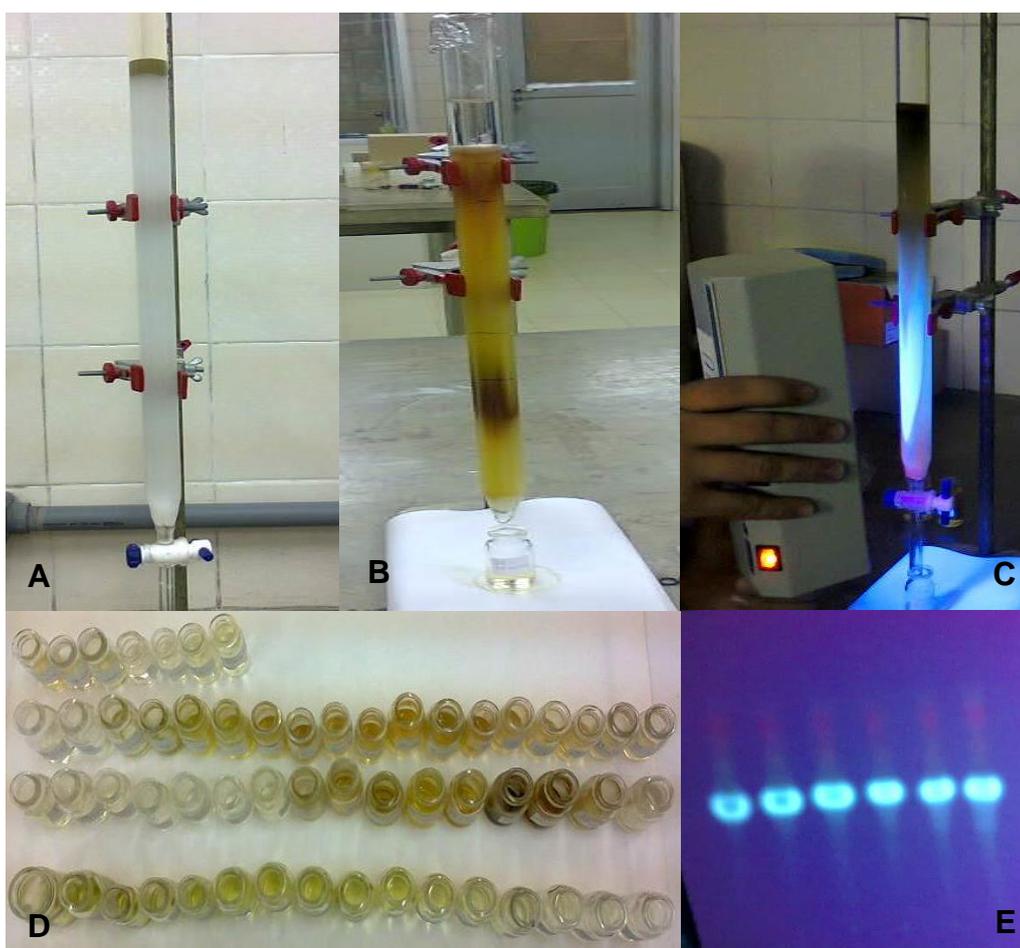


Figura 11. Etapas do fracionamento da PDCM em coluna cromatográfica. (A) Coluna preparada com 480 mg de amostra; (B) Desenvolvimento da coluna; (C) Acompanhamento de separação das frações com lâmpada UV 356 nm; (D) Frações recolhidas da coluna cromatográfica; (E) Reunião das frações semelhantes após análise em CCD.

#### 4.6.4. ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS ATIVAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PREPARATIVA (CCDP)

O isolamento das substâncias ativas no ensaio de Bioautografia foi realizado pelo método de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), no qual 0,5 mL (10 mg/mL) da amostra foram aplicados em placas de sílica gel 60 CCM ALUGRAM®Xtra SIL G/UV254 (8x10 cm) com o auxílio de micros-seringas e eluídos em Hex: AcOEt na proporção de 50:50 v/v, mesmo sistema utilizado no bioensaio. Depois de eluída, 1 cm da placa foi revelada com solução de anisaldeído seguido de aquecimento em estufa a 100°C para calcular o Rf das substâncias ativas.

Após comparar o Rf com a placa revelada, parte da placa não revelada foi cortada em pedaços pequenos e transferidos para frascos de vidro (Figura 12). As substâncias que estavam na sílica foram extraídas com acetato de etila com o auxílio do banho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner Unique®), em seguida essa solução foi filtrada com algodão e concentrada no rotaevaporador (Rotaevaporador IKA® RV10 basic). As amostras B1 e B2 foram enviadas para análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas descrita na seção 4.7 na página 43.



Figura 12. Isolamento de substâncias ativas por CCDP. A área demarcada indica a região que foi comparada, cortada e extraída para identificação.

#### 4.7. IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS

A identificação das substâncias presentes nas amostras ativas foi realizada no laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP (CPQBA/UNICAMP), pelo método de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás Agilent, modelo HP-6890 equipado com um detetor seletivo de massas Agilent (Figura 13), modelo HP-5975 utilizando uma coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m) nas seguintes condições: temperatura do injetor = 250°C, coluna = 110°C, taxa de aquecimento de 5°C·min<sup>-1</sup> até 280°C (26 min) e detetor = 300°C. Hélio foi utilizado como gás de arraste numa vazão de 1mL·min<sup>-1</sup>. Detetor seletivo de massas foi operado a 70 eV e m/z = 40 a 600 u.m.a.



Figura 13. Cromatógrafo a gás Agilent modelo HP-6890 equipado com um detetor seletivo de massas Agilent modelo HP-5975 utilizado no trabalho.

## 4.8. TRIAGEM BIOLÓGICA DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS

### 4.8.1. ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

Os extratos brutos e frações, ressuspendidos em dimetilsulfóxido (DMSO), foram testados quanto à ação antibacteriana em diferentes cepas padrões de bactérias potencialmente patogênicas adquiridas comercialmente na forma liofilizada da empresa Didática SP. As cepas padrões utilizadas nos ensaios antibacterianos foram: *Enterococcus faecalis* CCCD-E002, *Escherichia coli* CCCD-E004, *Klebsiella pneumoniae* CCCD-K003, *Salmonella entérica* CCCD-S001, *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Proteus vulgaris* CCCD-P002, *Pseudomonas aeruginosa* CCCD-P004.

### 4.8.2. PADRONIZAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA

As cepas bacterianas liofilizadas foram inicialmente hidratadas em Caldo Brain Heart Infusion (CBHI) e incubadas a 37°C por 24 h para reativação. Após esse período, as bactérias reativadas foram semeadas em Ágar Brain Heart Infusion (ABHI) e reincubadas a 37°C por 24 h. Uma pequena fração de colônias em crescimento foi retirada e apropriadamente diluída em solução salina estéril (NaCl a 0,9%), para obtenção do inóculo no padrão de turbidez 0,5 na escala de Mac Farland (NCCLS, 2009), que equivale à concentração final de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL.

### 4.8.3. ENSAIO ANTIBACTERIANO QUALITATIVO / DIFUSÃO EM ÁGAR

Os testes qualitativos de atividade antimicrobiana dos extratos brutos (hexano, acetato de etila e metanol) das folhas e galhos de *P. hebetatum* e suas partições (PHex, PDCM, PAcOEt e PHidro) foram realizados em triplicata pelo método de difusão em ágar empregando-se a técnica proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009) esquematizada na figura 14.

Os micro-organismos foram inoculados em câmara de fluxo laminar, onde para cada 25 mL de meio Ágar Mueller-Hinton (AMH) fundido foram adicionados 500µl de inóculo padrão. Após a solidificação do ágar foram feitas cavidade circulares de 6 mm de diâmetro em pontos equidistantes, nos quais foram adicionados 20 µL dos extratos e partições de *P. hebetatum* na concentração de 4

mg/mL por poço. A gentamicina na concentração de 10 µg/mL foi utilizada como controle positivo e o dimetilsulfóxido (DMSO) como controle negativo.

As placas foram então incubadas a 37°C por 24 h. Após o período de incubação a atividade antibacteriana foi determinada pela mensuração do halo de inibição (mm) e analisada como segue (ALVES et al, 2000): inativo (< 9mm), pouco ativo (9-12mm), ativo (13-18mm) e muito ativo (>18mm).

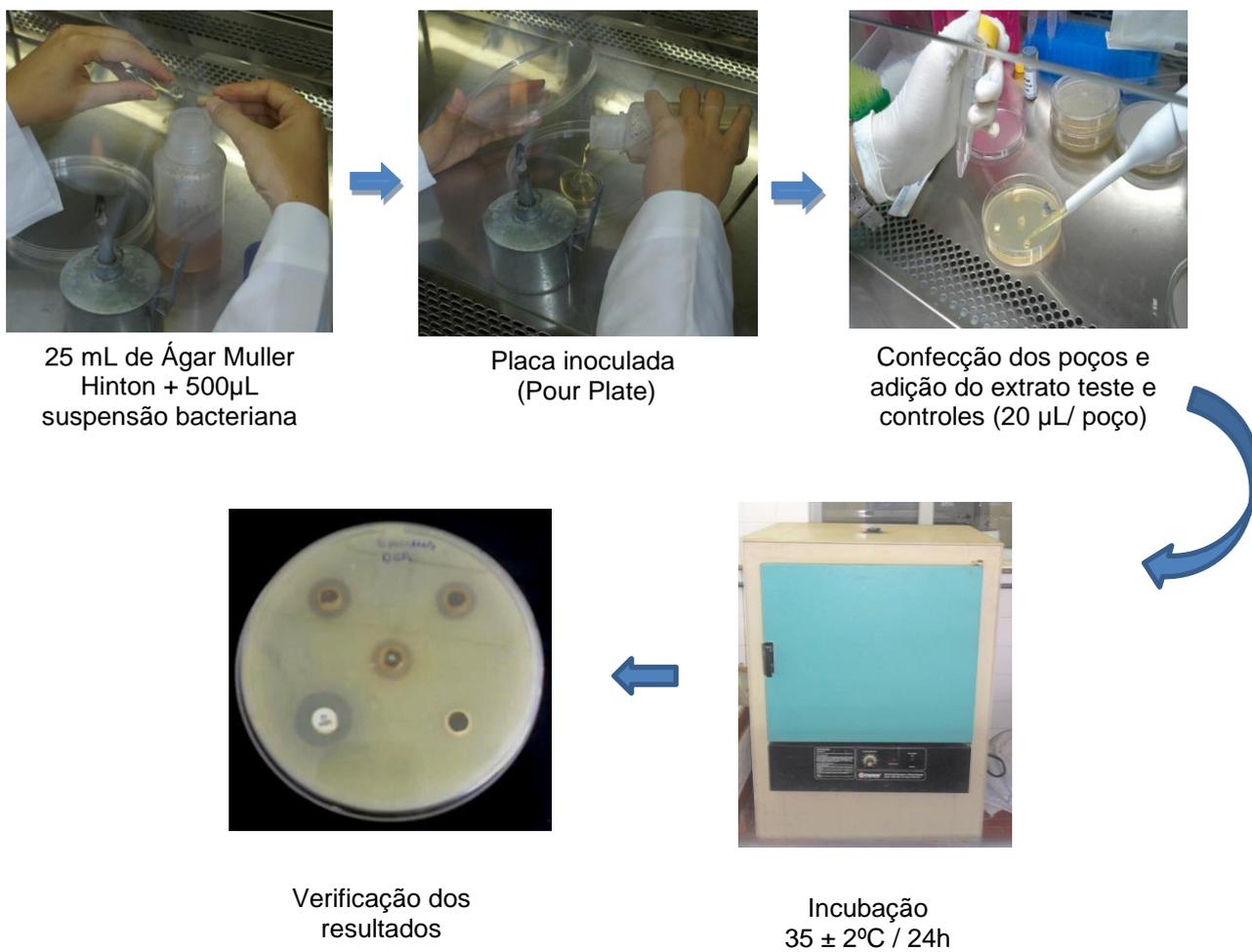


Figura 14. Esquema da metodologia Difusão em Ágar

#### 4.8.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) / DILUIÇÃO EM POÇO

Após a verificação da existência de atividade antimicrobiana no extrato e frações (FDCM, F1-F10) foram realizados ensaios de susceptibilidade para avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A CIM foi determinada somente para as amostras que apresentaram atividade no método de difusão em poço (halos de inibição com diâmetro maior ou igual a 9 mm). Para tanto, foi utilizada a técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006) esquematizada na figura 15.

Inicialmente, os inóculos foram padronizados frente à escala 0,5 de McFarland e submetidos à diluição em Caldo Mueller-Hinton (CMH) para atingir a concentração final de  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L do meio de cultura com inóculo microbiano e 100  $\mu$ L da amostra em concentrações seriadas (4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,500 mg/mL, 0,250 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,06 mg/mL e 0,03 mg/mL) em cada poço da placa de ELISA. Foram feitos ainda poços com controle de crescimento do micro-organismo, esterilidade do meio, e controle positivo (Gentamicina 10  $\mu$ g/mL). As placas foram então incubadas a 37°C por 24 h para posterior verificação do crescimento microbiano.

Após o período de incubação foram adicionados 20  $\mu$ L do revelador resazurina (10 mg/mL) em cada poço das microplacas. As microplacas foram reincubadas por um período de 3 horas à temperatura de 37°C e analisadas quanto à mudança de coloração das culturas, a presença de cor azul representa ausência de crescimento bacteriano e de cor rosa a presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002). A concentração inibitória mínima foi revelada pela menor concentração que promoveu a inibição do crescimento microbiano, evidenciado pela permanência da coloração original.

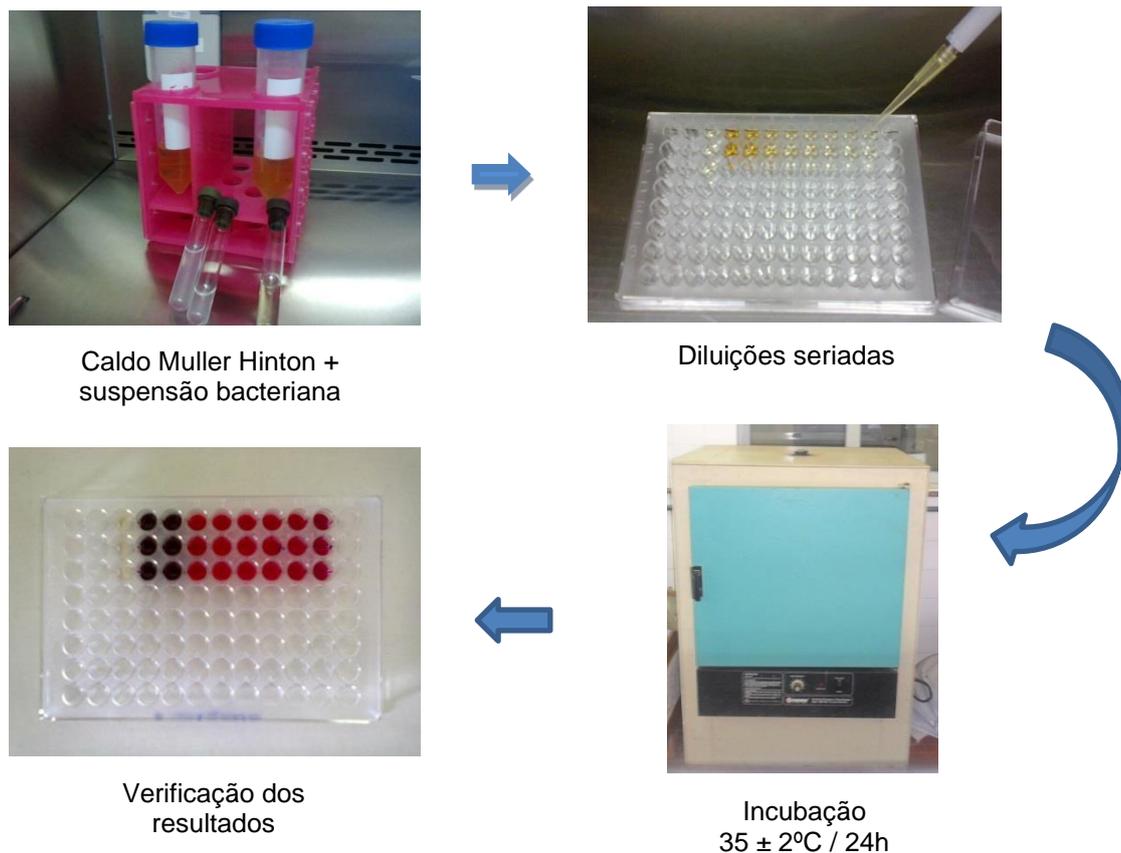


Figura 15. Esquema da metodologia para determinação a CIM.

#### 4.8.5. BIOAUTOGRAFIA DIRETA

Para determinar quais eram as substâncias responsáveis pela atividade antibacteriana apresentada pelas frações mais ativas e com bom rendimento foi realizado um teste de rastreamento chamado de Bioautografia Direta (CHOMA & GRZELAK, 2011) apenas contra *Staphylococcus aureus*.

Inicialmente 30  $\mu\text{L}$  das frações ativas foram aplicadas com auxílio de micropipetas em cromatoplasmas de sílica gel 60 CCM ALUGRAM®Xtra SIL G/UV254 (5,5 x 3 cm) e eluídas em Hex : AcOEt na proporção de 50:50 v/v, ajustado anteriormente. Após 30 minutos, os cromatogramas devidamente secos foram colocados em placas de Petri (90 x 15 mm) estéreis, onde foram adicionados 15 mL do meio ágar Mueller Hinton contendo 300  $\mu\text{L}$  do inóculo padrão do *S. aureus* devidamente ajustados a uma escala de 0,5 de MacFarland que equivale à concentração final de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL e 600  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa do revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) na concentração de 20 mg/mL.

Após a solidificação do meio, as placas de Petri foram incubadas a 37°C por 18 h. Passado o período de incubação, os halos de inibição (pontos incolores) foram visualizados contra um fundo vermelho na superfície da placa apontando a presença de substâncias antibacterianas (DUARTE et al., 2005) (Figura 16).

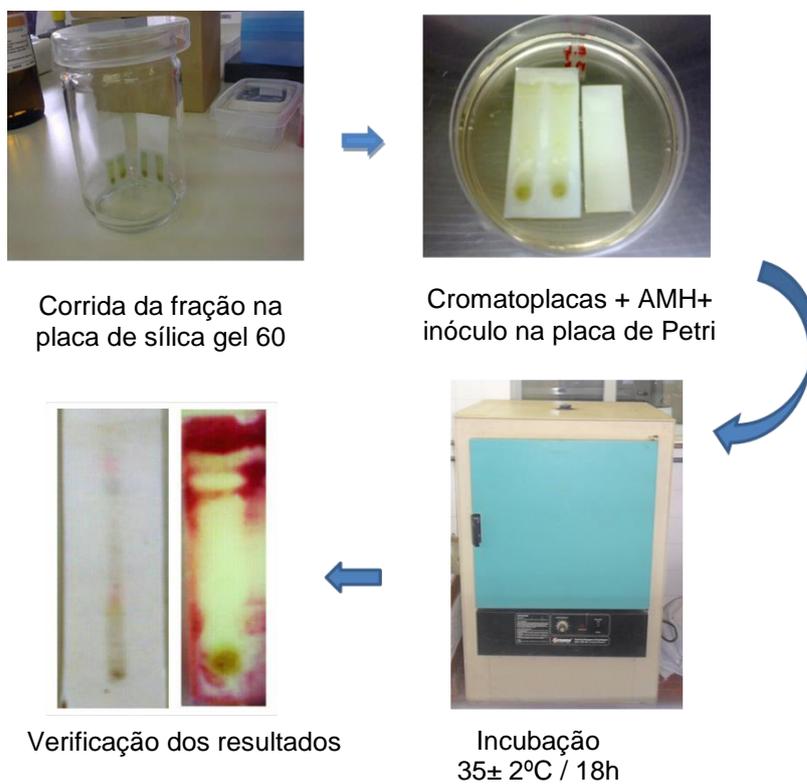


Figura 16. Esquema do método bioautográfico.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o processo de extração por maceração acoplada ao ultrassom das folhas e galhos de *P. hebetatum* utilizando hexano, acetato de etila e metanol, sequencialmente, os extratos obtiveram os rendimentos apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Rendimento dos extratos das folhas e galhos da espécie *P. hebetatum*

Partes da Planta	Solventes	Material Moído (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (%)
Folhas	Hexano	480	6,64	1,38
	Acetato de Etila		8,84	1,84
	Metanol		53,27	11,09
Galhos	Hexano	638	6,17	0,97
	Acetato de Etila		7,31	1,14
	Metanol		38,77	6,07

O resultado da prospecção fitoquímica das soluções extrativas de folhas e galhos de *P. hebetatum* está apresentado na tabela 3. O *screening* demonstrou que a espécie apresenta classes de substâncias que lhe confere significativa importância farmacológica, dentre as quais, destacam-se os triterpenos e esteroides e a classe das cumarinas (Figura 17), que já foram isoladas de outras espécies do mesmo gênero e possuem uma ampla gama de atividade biológicas comprovadas, incluindo, atividade antimicrobiana.

Outra classe importante é a dos flavonoides. Alguns medicamentos são elaborados a partir deles, em particular para o tratamento de doenças circulatórias e hipertensão. Pesquisas sugerem que alguns flavonoides são responsáveis por ação antitumoral, antivirais, antimicrobianos, antioxidante, anti-hemorragicos e anti-inflamatórios (COSTA, 2001).

Tabela 3. Resultado da prospecção fitoquímica de galhos e folhas de *P. hebetatum*.

CLASSES	GALHOS	FOLHAS
Alcaloides	-	-
Cumarinas	+	+
Antraquinonas	-	-
Triterpenos e Esteroides	+	+
Heterosídeos Antociânicos	+	+
Heterosídeos Saponínicos	+	+
Heterosídeos Cianogénéticos	-	-
Flavonoides	+	+
Aminogrupos	-	-
Fenóis	+	+
Ácidos Orgânicos	+	+
Ácidos Voláteis	+	+
Gomas, Taninos, Mucilagens	+	+
Taninos condensados	+	+

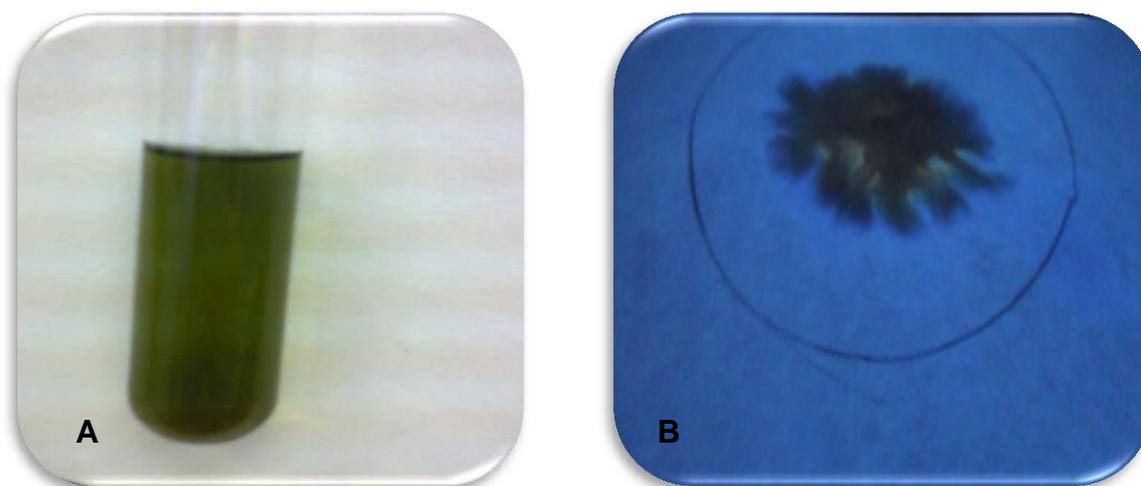


Figura 17- Prospecção fitoquímica de folhas e galhos de *P. hebetatum*. (A) Presença de triterpenos e esteroides indicada pelo desenvolvimento da coloração verde. (B) Presença de cumarina indicada pela mancha fluorescente sob luz ultravioleta.

Por se tratar de um estudo fitoquímico biomonitorado, a partir dos extratos secos, fez-se os testes de difusão em poço, a fim de triar os extratos que apresentariam atividade antibacteriana e assim direcionar o fracionamento em busca de substâncias bioativas.

Os micro-organismos utilizados nos experimentos de avaliação da atividade antibacteriana foram escolhidos por serem as bactérias empregadas rotineiramente para esse tipo de estudo, sendo também responsáveis por várias formas de infecções em humanos e adquirirem, com mais frequência, resistência aos antimicrobianos (OPLUSTIL et al., 2000).

De acordo com a mensuração do halo de inibição, o extrato metanol dos galhos foi ativo frente à *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris*. Para *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* e *Enterococcus faecalis* o extrato foi pouco ativo e inativo para *Staphylococcus aureus* e para *Pseudomonas aeruginosa*. Este resultado estar relacionado com a presença das classes de triterpenos e esteroides e cumarinas, conforme indicado pela prospecção fitoquímica, extraídas devido à afinidade dessas substâncias com a polaridade do solvente (GUIMARÃES et al., 2010). Os outros extratos foram inativos contra todos os micro-organismos testados como pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4. Atividade antibacteriana dos extratos de galhos e folhas de *P. hebetatum*.

AMOSTRAS <sup>a</sup>	CONCENTRAÇÃO	MICRO-ORGANISMOS TESTADOS <sup>b</sup>						
		S. a	E. f	K. p	S. e	P. a	E. c	P. v
EHexF	4 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-
EMeOHF	4 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-
EAcóETF	4 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-
EHeG	4 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-
EMeOHG	4 mg/mL	-	11 mm	11 mm	11mm	-	13mm	13mm
EAcóETG	4 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-
GENTAMICINA	10 µg/mL	17 mm	17 mm	17,5 mm	20mm	27mm	29mm	15mm
DMSO	100%	-	-	-	-	-	-	-

(-) não foi observado halo de inibição.

<sup>a</sup> Extratos testados - EHexF: extrato hexano de folhas; EMeOHF: extrato metanol de folhas; EAcóETF: extrato acetato de etila de folhas; EHeG: extrato hexano de galhos; EMeOHG: extrato metanol de galhos; EAcóETG: extrato acetato de etila de galhos.

<sup>b</sup> Micro-organismos testados – E.f: *Enterococcus faecalis*; E.c: *Escherichia coli*; K.p: *Klebsiella pneumoniae*; S.e: *Salmonella entérica*; S.a: *Staphylococcus aureus*; P.v: *Proteus vulgaris*; P.a: *Pseudomonas aeruginosa*.

Devido à atividade antibacteriana observada, 35 g do extrato metanol dos galhos foi submetido a uma partição líquido-líquido dando origem a quatro frações, cujo rendimento está apresentado na tabela 5.

Tabela 5. Rendimento das partições provenientes do extrato metanólico dos galhos de *P. hebetatum*

Partições	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexano	7,68	21,9
Diclorometano	0,502	1,43
Acetato de Etila	9,17	26,2
Hidrometanólica	14,93	42,65

Para direcionar o fracionamento, as partições foram submetidas a uma nova triagem utilizando novamente a metodologia de difusão em poço contra as mesmas cepas bacterianas anteriormente testadas. Dentre as partições analisadas, a PDCM foi ativa contra *S. aureus* (13 mm), pouco ativa para *E. faecalis* (11,3 mm) e inativa para as demais cepas testadas. Dessa forma, é possível inferir que as substâncias pouco polares presentes no extrato metanol sejam responsáveis pela atividade observada. As demais partições foram inativas contra todas as bactérias testadas como pode ser observado na tabela 6.

Tabela 6. Atividade antibacteriana das partições provenientes do extrato metanólico dos galhos.

AMOSTRAS <sup>a</sup>	CONCENTRAÇÃO	MICRO-ORGANISMOS TESTADOS <sup>b</sup>						
		S. a	E. f	K. p	S. e	P. a	P. v	E. c
PHex	4 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-
PDCM	4 mg/mL	13 mm	11,3 mm	-	-	-	-	-
PAcoET	4 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-
PHidro	4 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-
GENTAMICINA	10 µg/mL	16 mm	21 mm	16 mm	16 mm	23 mm	19 mm	29mm
DMSO	100%	-	-	-	-	-	-	-

(-) não foi observado halo de inibição.

<sup>a</sup> Partições testadas - PHexF: partição hexano; PDCM: partição diclorometano; PAcoETF: partição acetato de etila; PHidro: partição hidrometanólica.

<sup>b</sup> Micror-organismos testados – E.f: *Enterococcus faecalis*; E.c: *Escherichia coli*; K.p: *Klebsiella pneumoniae*; S.e: *Salmonella entérica*; S.a: *Staphylococcus aureus*; P.v: *Proteus vulgaris*; P.a: *Pseudomonas aeruginosa*.

Quando a partição diclorometano é comparada com o extrato metanol dos galhos, nota-se que a partição foi ativa contra as bactérias Gram-positivas, mas se mostrou inativa contra as bactérias Gram-negativas (Figura 18). De acordo com Guimarães et al. (2010), em geral, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes à ação de antibióticos, devido à natureza mais complexa da parede celular, que não são capazes de cruzar efetivamente esta barreira lipídica, o que as torna menos suscetíveis aos agentes antimicrobianos. Por outro lado, as bactérias Gram-positivas apresentaram-se mais sensíveis. As bactérias Gram-negativas são citadas por possuírem resistência a muitos dos antibióticos comercializados, sendo a *E. coli* a mais proeminente.

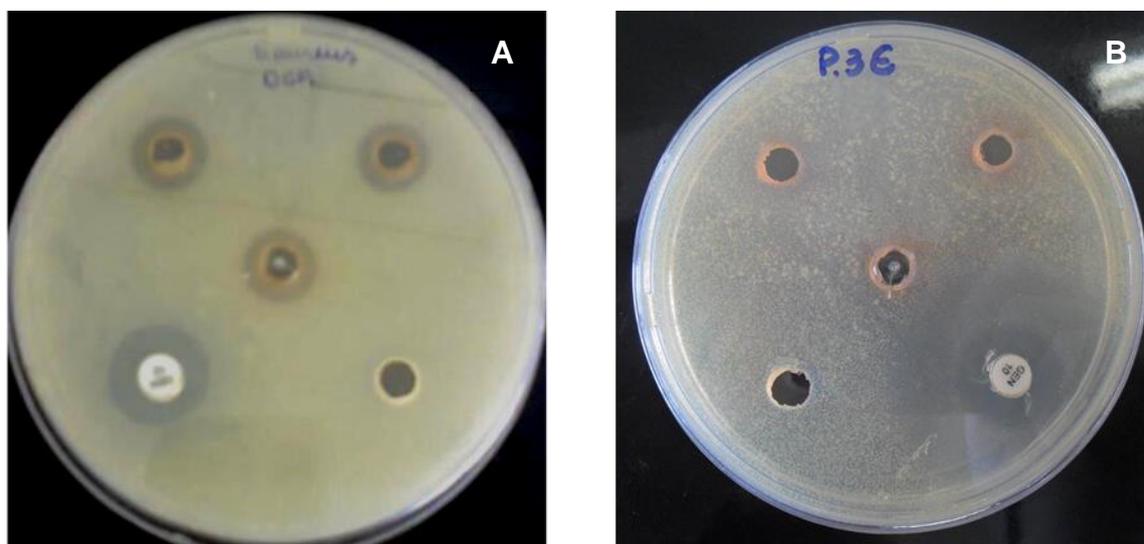


Figura 18. Análise da partição diclorometano no teste de difusão em poço. (A) Atividade antibacteriana da partição diclorometano contra *S. aureus*; (B) Ausência de atividade antibacteriana contra *E. coli*.

A partir dos resultados obtidos, a partição diclorometano foi selecionada para ser fracionada por cromatografia em coluna, originando 36 frações. Após análise por CCD, as frações semelhantes quimicamente foram agrupadas resultando o total de 10 frações (figura 19). Abaixo, a tabela 7 traz o rendimento de cada uma delas.

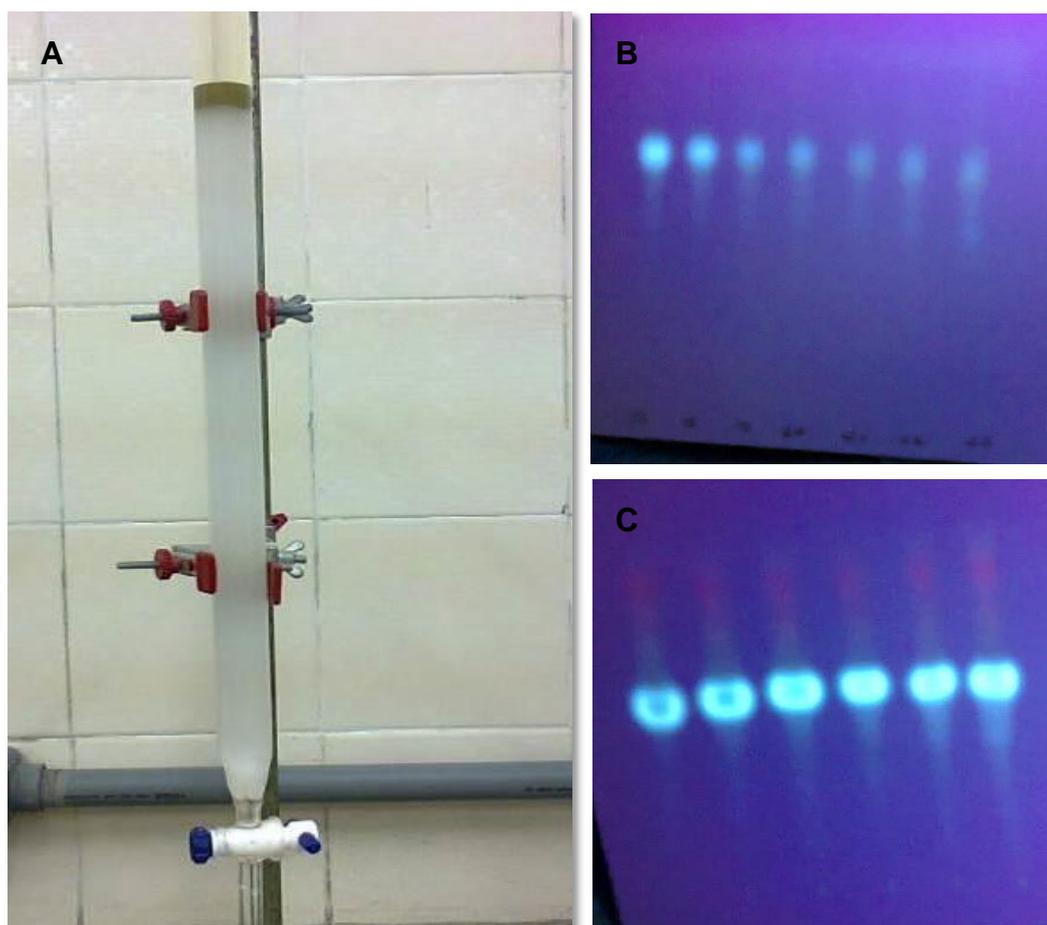


Figura 19. Análise cromatográfica da fração diclorometano. (A) Detalhe da coluna empacotada com sílica gel 60; (B) Análise por CCD das F17-F23 no sistema Hex: AcoET 70:30 e revelada com UV 360nm; (C) Análise por CCD das Frações F11-F16 em AcoET e revelada com UV 360nm.

Tabela 7. Frações obtidas da coluna cromatográfica da fração diclorometânica e seus rendimentos

FRAÇÕES	MASSA (mg)	RENDIMENTO %
F1	84	17,5
F2	43	8,9
F3	31	6,4
F4	27	5,6
F5	103	21,4
F6	29	6,0
F7	43	8,9
F8	18	3,7
F9	19	3,9
F10	14	2,9

A partir das frações provenientes da coluna cromatográfica, foi realizada uma nova triagem de atividade antibacteriana. Devido ao baixo rendimento das frações foi utilizada a metodologia de microdiluição em caldo, que permite a análise de substâncias em pequenas quantidades.

De acordo com os resultados obtidos na primeira triagem biológica, o extrato metanol dos galhos apresentou atividade antibacteriana contra *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *E. coli* e *P. vulgaris* que foi quantificada através do ensaio de microdiluição em caldo. A concentração inibitória mínima frente a cada micro-organismo está apresentada na tabela 8.

Tabela 8. Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato metanólico dos galhos de *P. hebetatum*

AMOSTRA TESTADA	CIM (µg/mL)						
	MICRO-ORGANISMOS						
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>
EMeOHG	1000	1000	2000	2000	1000	2000	2000

Na literatura não há uma classificação consensual sobre os valores de CIM. Aligiannis et al. (2001) apresentaram a seguinte classificação: CIM até 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. Por sua vez, Webster et al. (2008) propuseram um valor de CIM satisfatório de até 1000 µg/mL. Seguindo a primeira classificação, o extrato metanol dos galhos de *P. hebetatum* mostrou-se um inibidor moderado para *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* e inibidor fraco para *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *E. coli* e *P. vulgaris*.

Como pode ser observado, o extrato metanol mostrou ser um inibidor moderado contra *P. aeruginosa* e *S. aureus* quando testado com o método de microdiluição em caldo, enquanto que no teste de difusão em ágar se mostrou inativo. É possível inferir que como a técnica de difusão em ágar é um teste qualitativo baseado na difusão das amostras pelo ágar para que estes exerçam a ação, a falta de atividade antibacteriana pode ser atribuída à falta de difusibilidade do extrato. Nesse contexto, Valgas et al. (2007) propõem que essa variação pode ser justificada pela composição química das amostras, pois moléculas mais polares ou de maior massa molecular tendem ser mais solúveis e de mais fácil dispersão em

meio líquido que em meios sólidos. A concentração inibitória mínima contra *S. aureus* e *E. faecalis* da partição diclorometano e suas frações subsequentes está apresentada na tabela 9.

Tabela 9. Concentração inibitória mínima da fração diclorometânica e suas frações subsequentes

AMOSTRAS TESTADAS	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	MICRO-ORGANISMOS	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
PDCM	1000	500
F1	1000	2000
F2	1000	2000
F3	2000	1000
F4	2000	1000
F5	1000	1000
F6	1000	1000
F7	2000	2000
F8	2000	2000
F9	4000	4000
F10	4000	4000

No teste de microdiluição em caldo, observou-se que mais da metade das frações (F3, F4 e F7 - F10) são classificadas como inibidores fracos, visto que a CIM foi acima de 1,5 mg/mL. Entretanto, destaca-se a PDCM, que foi considerado um inibidor moderado com *S. aureus* (CIM de 1 mg/mL) e um potente inibidor contra *E. faecalis* (CIM de 0,5 mg/mL), além das frações F1, F2, F5 e F6 que demonstraram ser inibidores moderados contra *S. aureus* (CIM de 1 mg/mL).

Um estudo fitoquímico biomonitorado realizado por Martins et al. (2012) com extrato metanólico das folhas de *Larrea Tridentata*, uma fração proveniente do mesmo apresentou uma CIM de 62,5  $\mu\text{g/mL}$  contra *S. aureus*. Em outro estudo realizado por Mendes et al. (2011), o extrato etanólico de *Portulaca pilosa* apresentou uma CIM de 62,5  $\mu\text{g/mL}$  contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Contudo, apesar das CIMs determinadas neste estudo não serem tão expressivas como as de outras espécies relatadas na literatura, elas constituem-se em resultados inéditos sobre *Protium hebetatum* e acrescentam informações relevantes ao conhecimento científico da espécie.

Dentre todas as frações ativas, ou seja, com CIM  $\leq$  1 mg/mL (PDCM, F1, F2, F5 e F6) apenas a F1 foi selecionada para da seguimento na pesquisa por

apresentar um bom rendimento, suficiente para realização de outro ensaio antibacteriano, além da identificação química. Adicionalmente, mostrou um perfil interessante na análise em CCD, apresentando-se mais rica quimicamente, como pode ser observado na figura 20.

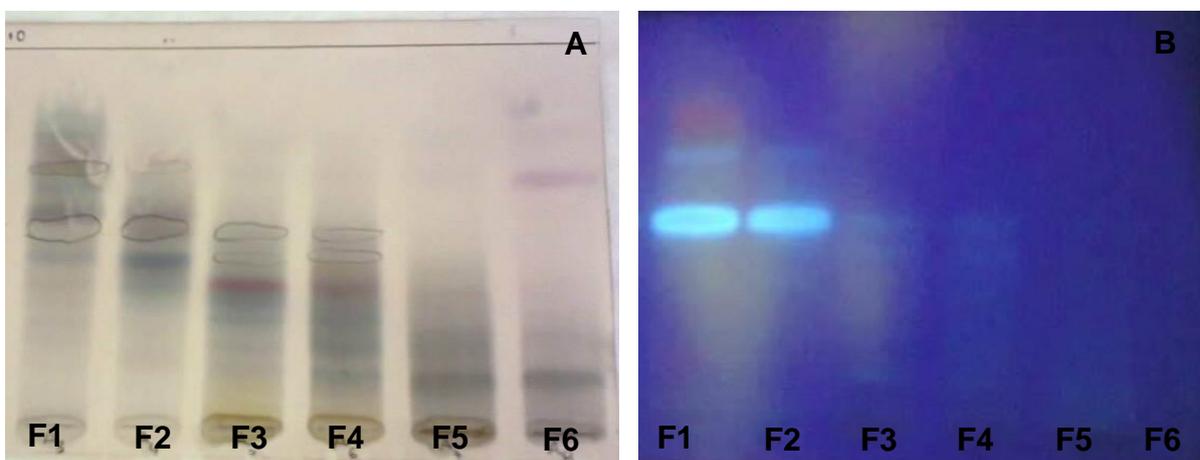


Figura 20. Análise em CCD do perfil químico das frações mais ativas. (A) Placa cromatográfica comparativa das frações F1-F6 revelada com Anisaldeído; (B) Placa cromatográfica comparativa das frações F1-F6 revelada com UV 360 nm. Eluente:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 90:10.

A fração F1 foi submetida ao teste de Bioautografia contra *Staphylococcus aureus* para verificar se uma substância isolada é responsável pela atividade antimicrobiana ou se esta se deve a uma ação sinérgica entre os compostos presentes. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que a amostra apresentou halo de inibição ao redor de todos os compostos presentes na placa de CCD, indicando que a mesma é rica em substâncias bioativas, sugerindo também que a atividade antibacteriana observada no extrato metanol dos galhos, partições e frações subsequentes não estava relacionada apenas a uma substância ativa, mas a uma ação sinérgica dos compostos da mistura, uma vez que foi mais ativo quantitativamente que as amostras obtidas pelo seu fracionamento. A figura 21 mostra o resultado da bioautografia de F1.

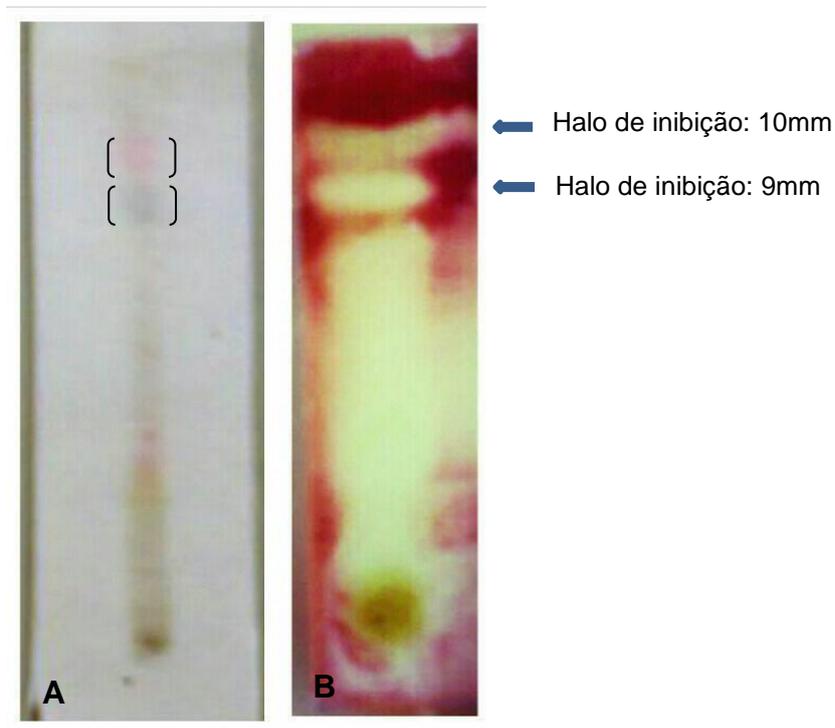


Figura 21. Agentes antibacterianos de F1 identificados pelo método de Bioautografia. (A) Placa revelada com anisaldeído; (B) Placa Revelada com TCC. Eluente: Hex : AcOET 50:50.

As substâncias rosa e roxa (destacadas por colchetes na figura 22A) destacaram-se devido ao bom perfil de separação, o que permitia seu isolamento. Além disso, mostraram ativas quando reveladas com TCC (figura 22B). Essas substâncias foram isoladas através do método clássico de Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), uma técnica simples, rápida e de baixo custo, frequentemente empregada para isolamentos de substâncias com rendimentos mínimos.

A partir da técnica CCDP, foram originadas mais duas frações, denominadas B1 e B2 (Figura 22), que juntamente com as frações PDCM, F1, F2, F3, F4 e F5, foram analisadas pelo método de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) no laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP (CPQBA/UNICAMP).

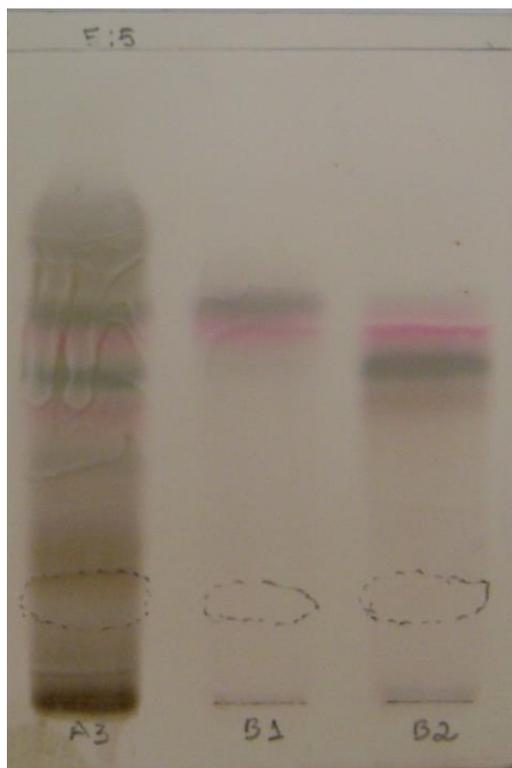


Figura 22. Análise por CCD da F1 e das amostras B1 e B2. Revelador: Anisaldeído.  
Eluente: Hex: AcOEt 50:50.

Os espectros de massas (fragmentogramas) foram obtidos para cada sinal observado nos cromatogramas e os mesmos foram comparados com os dados da biblioteca NIST MS Search 2.0 (National Institute of Standards of Technology) do equipamento e também com os dados descritos na literatura para os compostos isolados de *P. hebetatum* obtido por cromatografia em coluna por Costa et al. (2012).

Nas figuras 23 e 24 estão apresentadas o cromatograma obtido para a F1 e o espectro de massas do composto majoritário da F1 que apresentara o  $t_R$  19,48min e massa molecular de 192 g/mol, respectivamente.

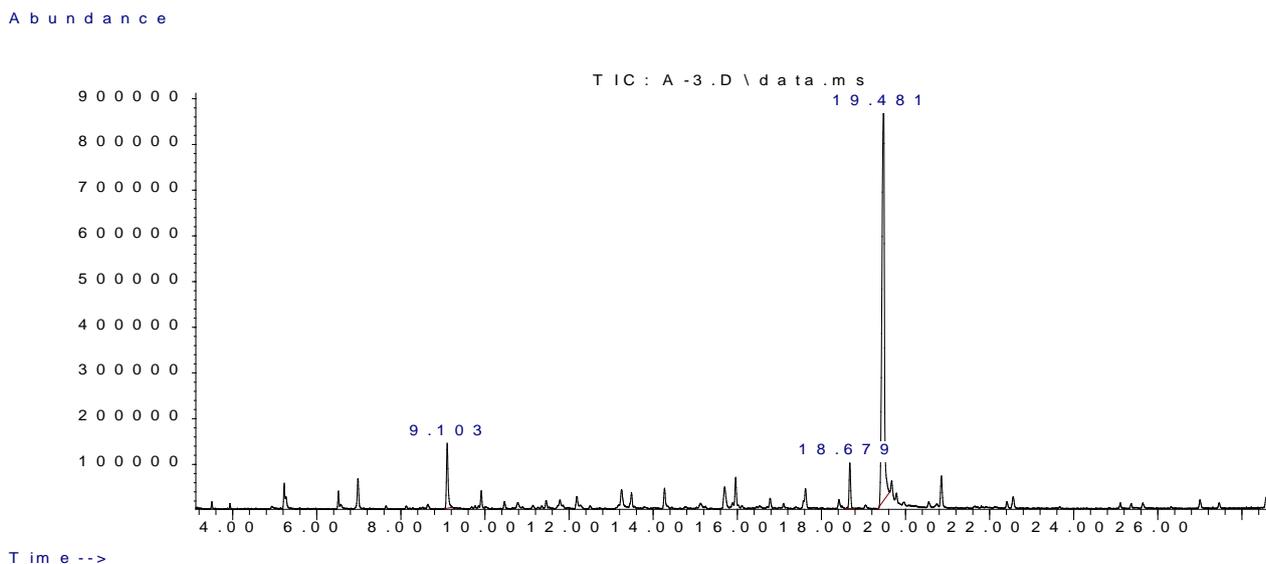


Figura 23. Cromatograma da F1 de *P. hebetatum*.

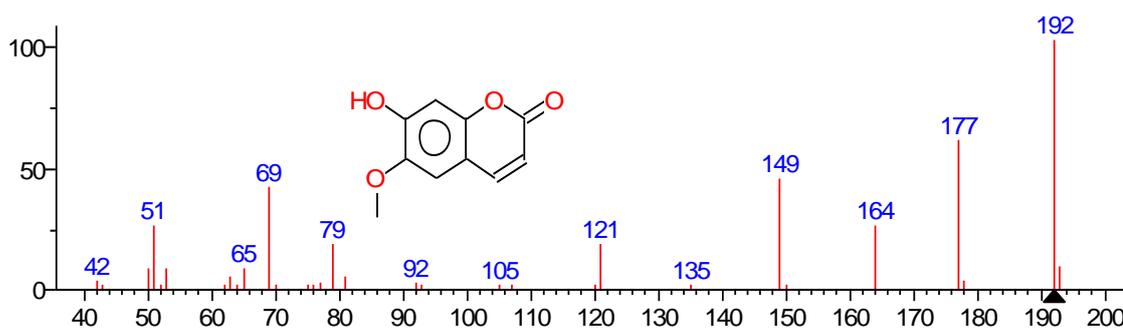


Figura 24. Espectro de massas da escopoletina com  $t_R$  19,48min da F1 de *P. hebetatum*.

Analisando o espectro de massas do composto apresentado na figura 24 e comparando os resultados obtidos com os descritos por Costa et al. (2012), podemos afirmar que o composto com tempo de retenção 19,48 min refere-se a cumarina escopoletina (MM = 192), composto majoritário da F1 com área relativa de 49,85%. Outras substâncias que foram posteriormente identificadas não estão apresentadas na figura 24.

Foi comprovado neste trabalho, a partir dos resultados obtidos no teste de Bioautografia e na identificação por CG-EM, que a escopoletina é uma das substâncias ativas identificada no extrato metanol dos galhos de *P. hebetatum*. Esse dado encontra embasamento na literatura científica, visto que é sabido que escopoletina é uma cumarina com atividade bactericida contra várias espécies de micro-organismos, incluindo *S. aureus* e *Escherichia coli* (Arisawa et al., 1983). Na

tabela 10 estão apresentados os principais compostos identificados através da análise por CG-EM da F1 de *P. hebetatum*.

Tabela 10. Compostos presentes na F1, Massa Molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas.

$t_R$ (min)	Composto	MM (g/mol)	% Área relativa
6,98	1,3-Benzodioxole-5-carboxaldehyde - <i>Piperonal</i>	150	2,33
9,11	2-Metoxi-4-[(E)-prop-1-enil]fenol - <i>Isoeugenol</i>	164	5,25
14,27	2,6-dimetoxi-4-prop-2-enilfenol - <i>Metoxieugenol</i>	194	1,70
15,72	Derivada do <i>Metoxieugenol</i>	212	2,42
18,68	Hexadecanoato de metila	270	3,28
19,48	6-metoxi,7-hidroxi-cumarina - <i>Escopoletina</i>	192	49,85
19,67	6,7-dimetoxi-cumarina - <i>Escoparona</i>	206	2,10

A partir do isolamento por CCDC, das substâncias ativas da F1 contra *S. aureus* no teste de Bioautografia, foram originadas duas novas frações (B1 e B2) cujo cromatogramas estão apresentados na figura 25 e 26, respectivamente.

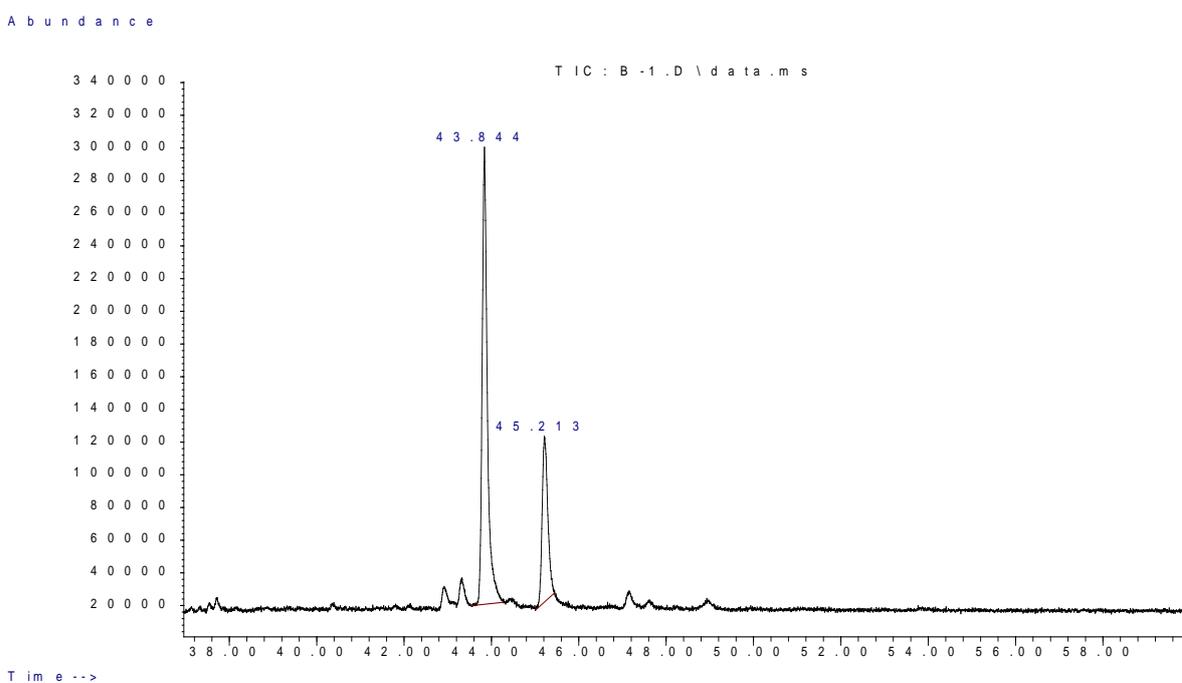


Figura 25. Cromatograma de B1 obtida de F1 por CCDC.

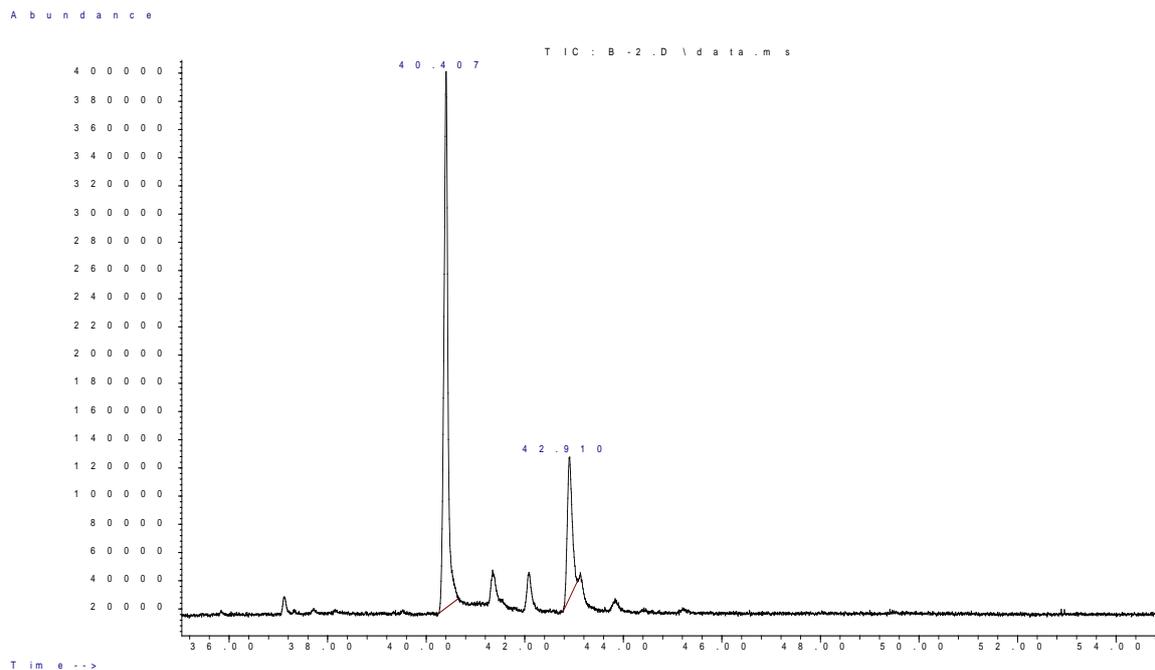


Figura 26. Cromatograma de B2 obtida de F1 por CCDC.

Na fração B1 foi identificada uma mistura de  $\alpha$ -amirina com tempo de retenção 43,84 minutos e  $\beta$ -amirina com o tempo de retenção de 45,21 minutos. Esses triterpenos já foram isolados anteriormente a partir de extratos de folhas e resinas de espécies do gênero *Protium*, mostrando que são constituintes preponderantes nessas espécies.

Sendo assim, de acordo com os resultados obtidos no teste de bioautografia, seguido de isolamento por CCDP, e identificação por CG-EM, a atividade antibacteriana de *P. hebetatum* deve-se também a presença da mistura das substâncias ativas de  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina. Nas figuras 27 e 28 estão apresentados seus respectivos espectros de massas, seguido da tabela 11 que apresenta a massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas.

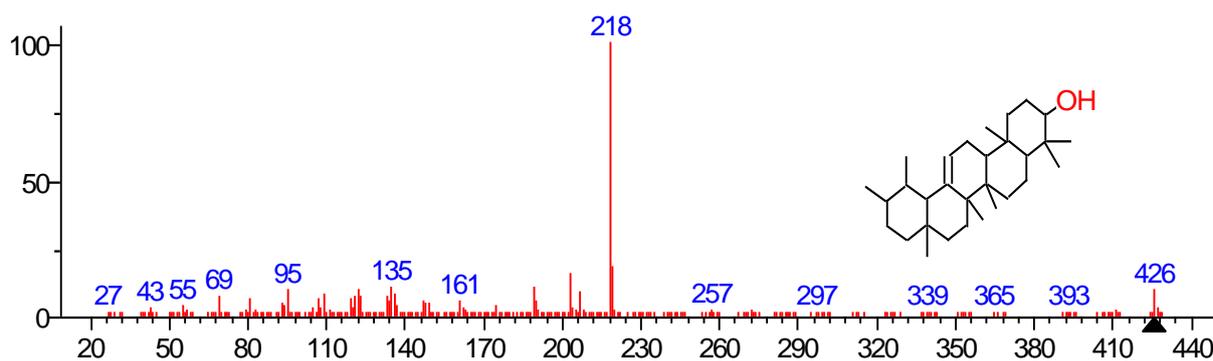


Figura 27. Espectro de massas da substância ativa  $\alpha$ -amirina.

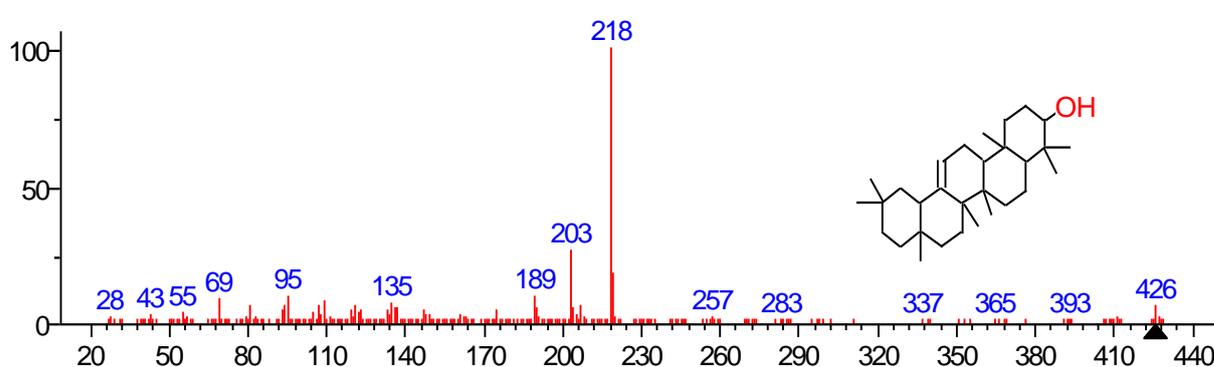


Figura 28. Espectro de massas da substância ativa  $\beta$ -amirina.

Tabela 11. Compostos presentes na amostra B1, massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas.

$t_R$ (min)	Composto	MM (g/mol)	% Área relativa
43,84	(3 $\beta$ )-Urs-12-en-3-ol - $\alpha$ -amirina	426	68,70
45,21	Olean-12-en-3-ol - $\beta$ -amirina	426	31,30

A partir do cromatograma gerado pela fração B2 (figura 26), foi possível identificar o constituinte piperonal com o tempo de retenção de 6,98 minutos, o estigmasterol com tempo de retenção de 41,35 minutos e o sitosterol, com tempo de retenção de 42,91 minutos. Não foi possível identificar o constituinte majoritário dessa fração com o método utilizado. O esteroide estigmasterol, além da escopoletina, já tinha sido isolado e identificado no extrato éter etílico do tronco de *P. hebetatum* em um estudo realizado por Costa et al. (2012) e no extrato éter etílico de casca de *P. paniculatum* no estudo de Zognhi et al. (1993).

Nas figuras 29 e 30 estão apresentados os espectros de massas das substâncias piperonal e estigmasterol, identificadas na fração B2, seguido da tabela

12 com massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas.

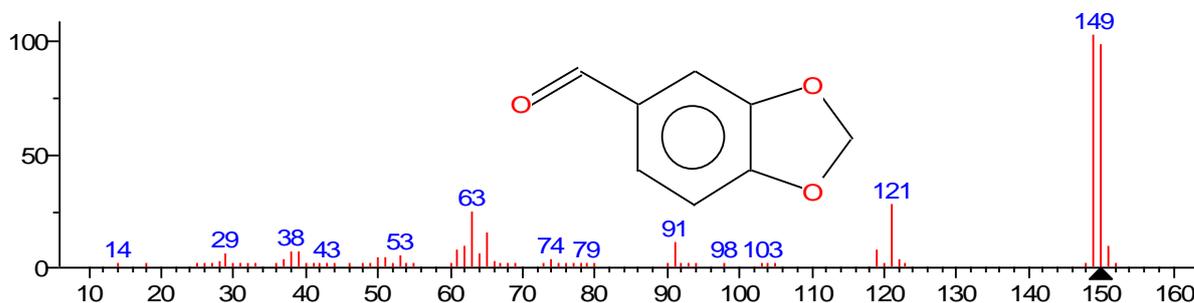


Figura 29. Espectro de massas da substância ativa Piperonal.

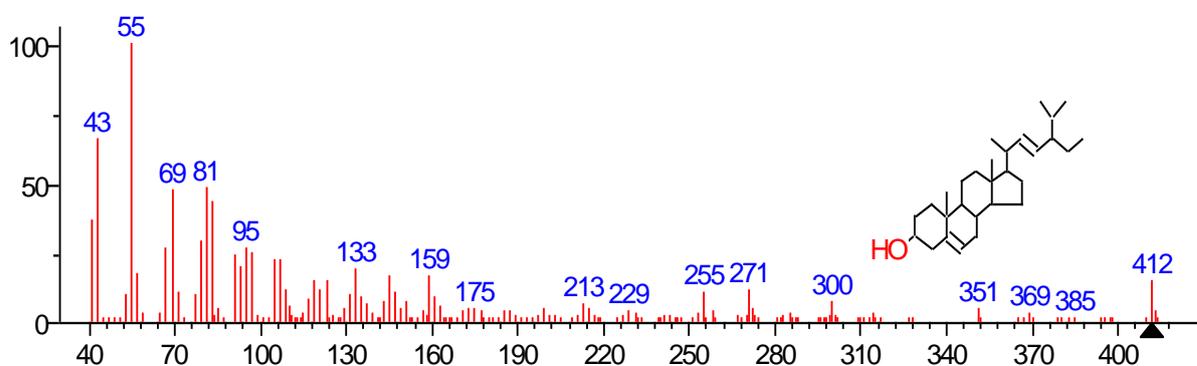


Figura 30. Espectro de massas da substância ativa Stigmasterol.

Tabela 12. Compostos presentes na amostra B2 de *P.hebetatum*, massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas

$t_R$ (min)	Composto	MM (g/mol)	% Área relativa
6,98	1,3-Benzodioxole-5-carboxaldehyde - <i>Piperonal</i>	150	2,29
40,40	N.i	352	48,60
41,35	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(E,2R,5S)-5etil-6-metilhept-3-em-2-il]-10,13-dimetil 2,3,4,7, 8,9,11, 12, 14, 15,16,17-dodecahidro-1H-ciclopenta[a]fenanthren-3-ol - <i>Estigmasterol</i>	412	5,44
42,08	N.i	429	3,52
42,93	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(2R,5R)-5-ethyl-6-methylheptan-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol - <i>Sitosterol</i>	414	18,15

\*N.i: Não identificado

As figuras 31 a 35 apresentam os cromatogramas de CG/EM das frações FDCM, F2 a F5 provenientes do extrato metanólico dos galhos de *P. hebetatum* nas mesmas condições de análise apresentadas acima, seguido de suas respectivas tabelas com massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas. Como proposto no estudo biomonitorado, foi dada prioridade as amostras mais ativas, por isso não feita a análise de identificação das frações F6, F7, F8, F9 e F10.

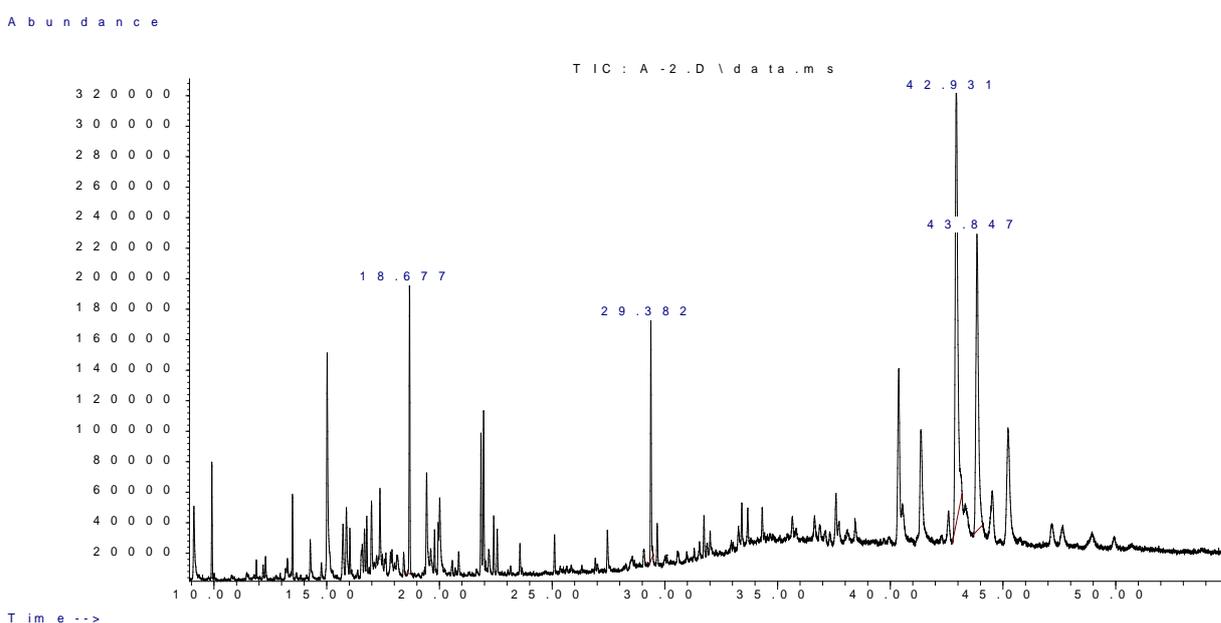


Figura 31. Cromatograma da PDCM de *P. hebetatum*.

Tabela 13. Compostos presentes na PDCM, massa molecular (MM), tempo de retenção (t<sub>R</sub>) e suas porcentagens relativas.

t <sub>R</sub> (min)	Composto	MM (g/mol)	% Área relativa
6,592	4-ethenil-2-metoxifenoL- <i>p-Vinilguaiacol</i>	150	1,79
9,987	1,3-Benzodioxole-5-carboxaldehyde - <i>Piperonal</i>	150	0,52
9,112	2-Metoxi-4-[(E)-prop-1-enil]fenol - <i>Isoeugenol</i>	164	1,35
12,286	<b>2.1</b> 3,4,5-trimetoxifenol - <i>Antiarol</i>	184	0,30
14,277	2,6-dimetoxi-4-prop-2-enilfenol - <i>Metoxieugenol</i>	194	0,57
15,022	4[(1E)-3-hidroxi-1-propenil]-2-metoxifenol	180	4,03
18,680	Hexadecanoato de metila	270	3,20
19,437	Cumarina, 6 metoxi,7-hidroxi - <i>Escopoletina</i>	192	1,94
20,016	5- hidroxi-escopoletina	210	1,92
21,848	9,12-octadecadienóico de metila	294	1,49
21,963	Ácido linoleico de metila	292	1,94
22,414	Ácido esteárico de metila	298	0,59
41,367	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(E,2,R,5S)-5etil-6-metilhept-3-em-2-il]-10,13-dimetil 2,3,4,7, 8,9,11, 12, 14, 15,16,17-dodecahidro-1H-ciclopenta[a]fenanthren-3-ol - <i>Estigmasterol</i>	412	4,32
42,932	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(2R,5R)-5-ethyl-6-methylheptan-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol - <i>Sitosterol</i>	414	17,53
43,854	Olean-12-en-3-ol - <i>β-amirina</i>	426	11,61

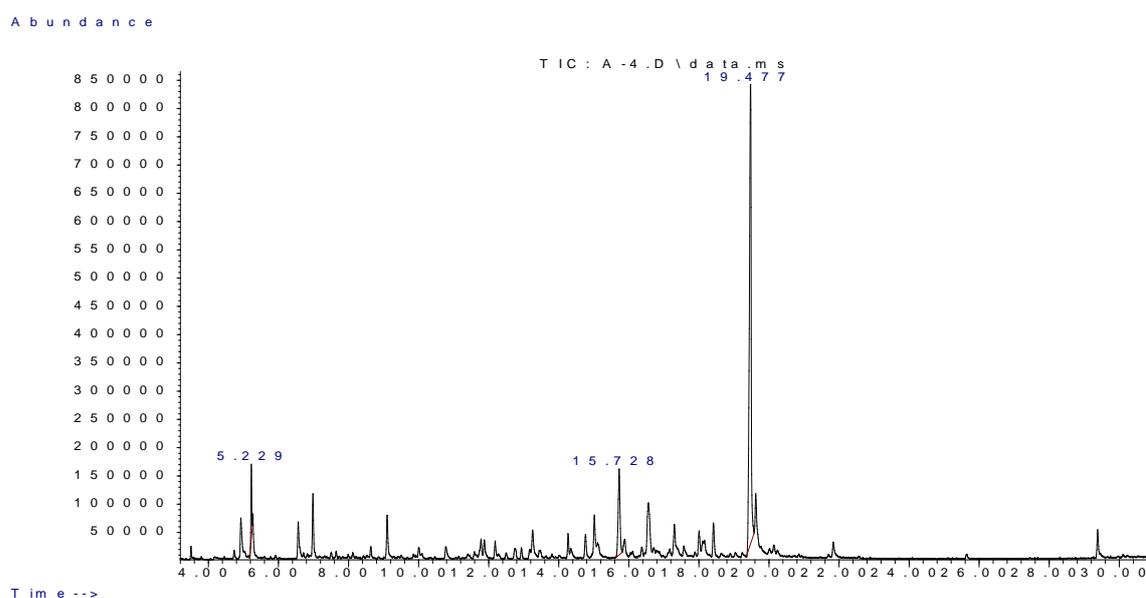
Figura 32. Cromatograma da F2 de *P. hebetatum*.

Tabela 14. Compostos presentes na F2, massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas.

$t_R$ (min)	Composto	MM (g/mol)	% Área relativa
4,932	Benzofuran, 2,3-dihidro - <i>Coumarana</i>	120	3,65
6,567	4-ethenil-2-metoxifenol- <i>p-Vinilguaiacol</i>	150	2,52
9,112	2-Metoxi-4-[(E)-prop-1-enil] fenol - <i>Isoeugenol</i>	164	2,79
14,271	2,6-dimetoxi-4-prop-2-enilfenol - <i>Metoxieugenol</i>	194	0,85
14,768	(1aR,4aR,7S,7aR,7bR)-1,1,7-trimetil-4 metilidene-1a,2,3,4a,5,6,7a,7b-octahidrociclopropa[h]azulen-7-ol- <i>Espatulenol</i>	220	1,71
15,022	4[(1E)-3-hidroxi-1-propenil]-2-metoxifenol	180	1,92
15,728	Derivada do <i>Metoxieugenol</i>	212	7,81
16,562	3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)propan-1-one – $\beta$ - <i>Hidroxi-propiovanillone</i>	196	6,04
19,482	Cumarina, 6metoxi, 7-hidroxi - <i>Escopoletina</i>	192	41,30
19,672	Cumarina, 6,7-dimetoxi - <i>Escoparona</i>	206	6,18
20,016	5- hidroxi-escopoletina	210	4,80

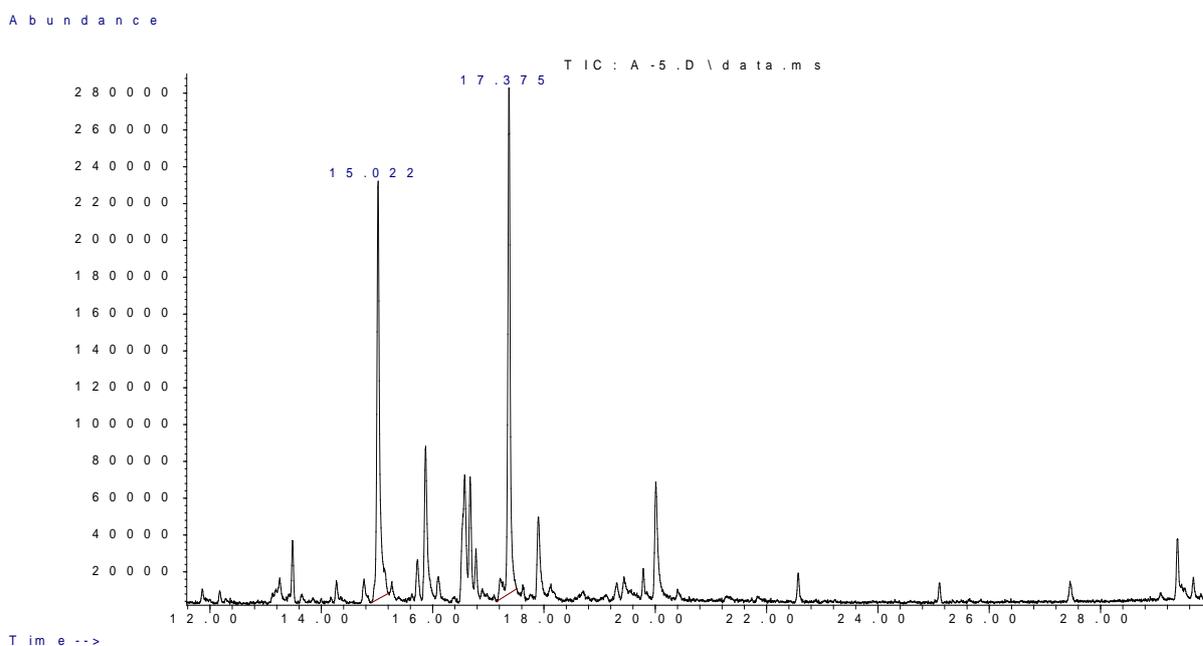


Figura 33. Cromatograma da F3 de *P. hebetatum*

Tabela 15. Compostos presentes na F3, massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas.

$t_R$ (min)	Composto	MM (g/mol)	% Área relativa
4,938	Benzofuran,2,3-dihidro - <i>Coumarana</i>	120	11,01
6,573	4-ethenil-2-metoxifenoL- <i>p-Vinilguaiacol</i>	150	8,86
9,112	2-Metoxi-4-[(E)-prop-1-enil]fenol - <i>Isoeugenol</i>	164	3,17
15,022	4[(1E)-3-hidroxi-1-propenil]-2-metoxifenol	180	17,19
16,581	(1aR,4aR,7S,7aR,7bR)-1,1,7-trimetil-4 metilidene-1a,2,3,4a,5,6,7a,7b-octahidrociclopropa[h]azulen-7-ol- <i>Espatuleno</i>	220	6,83
17,376	4,7-dihidroxi-6-metoxichromam-2-one	208	19,32
17,904	4,4,8-trimetiltriciclo[6.3.1.0(1,5)] dodecane-2,9 diol	220	3,47
20,016	5-hidroxi-escopoletina	210	4,80

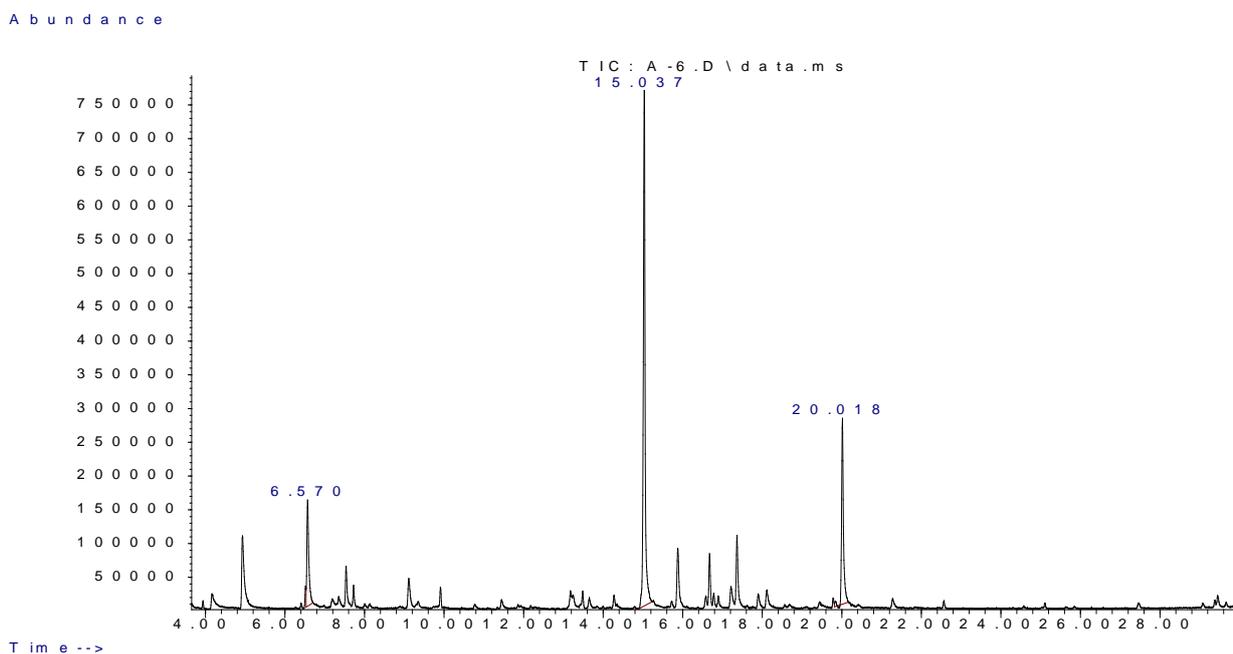


Figura 34. Cromatograma da F4 de *P. hebetatum*

Tabela 16. Compostos presentes na F4, massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas.

$t_R$ (min)	Composto	MM (g/mol)	% Área relativa
3,577	2-Metoxifenol - <i>o</i> -Guaiacol	124	1,44
4,168	Ácido benzóico	122	1,89
4,938	Benzofuran, 2,3-dihidro - <i>Coumarana</i> .	120	6,84
6,573	4-ethenil-2-metoxifenol- <i>p</i> - <i>Vinilguaiacol</i>	150	8,21
9,112	2-Metoxi-4-[(E)-prop-1-enil] fenol - <i>Isoeugenol</i>	164	2,46
14,278	2,6-dimetoxi-4-prop-2-enilfenol - <i>Metoxieugenol</i>	194	0,60
15,035	4[(1E)-3-hidroxi-1-propenil)-2-metoxifenol	180	34,95
20,016	5-hidroxi-escopoletina	210	13,73

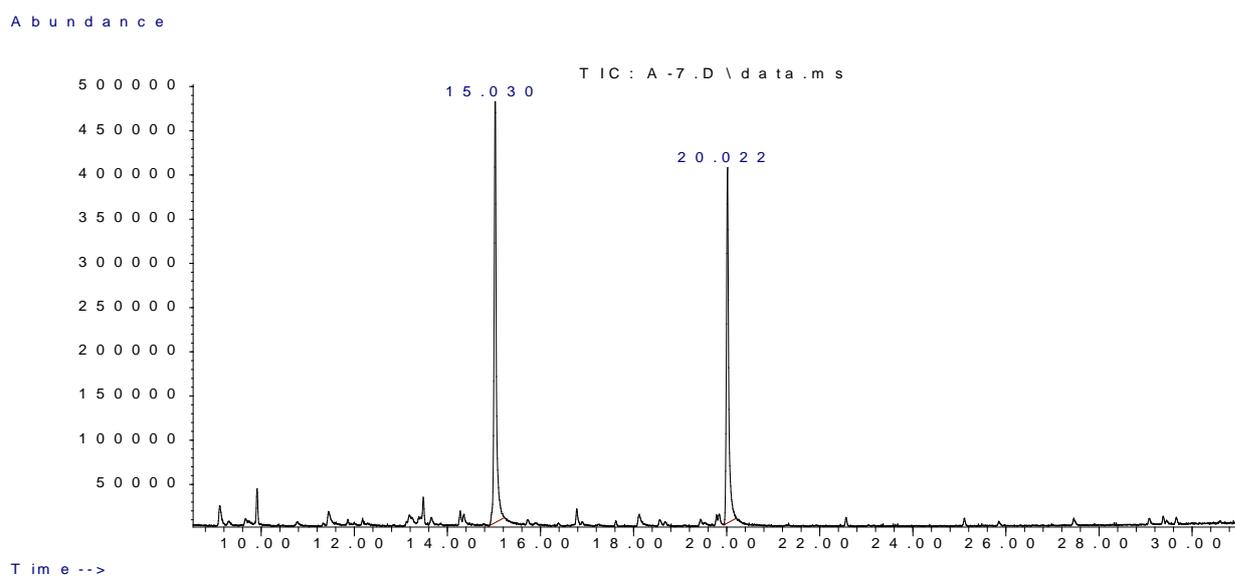


Figura 35. Cromatograma da F5 de *P. hebetatum*

Tabela 17. Compostos presentes na F5, massa molecular (MM), tempo de retenção ( $t_R$ ) e suas porcentagens relativas.

$t_R$ (min)	Composto	MM (g/mol)	% Área relativa
6,560	4-ethenil-2-metoxifenol- <i>p</i> -Vinilguaiacol	150	5,50
7,190	2,6-Dimetoxifenol- <i>Seringol</i>	154	1,73
9,112	2-Metoxi-4-[(E)-prop-1-enil] fenol - <i>Isoeugenol</i>	164	1,90
15,028	4[(1E)-3-hidroxi-1-propenil]-2-metoxifenol	180	36,47
20,022	5-hidroxi-escopoletina	210	29,73

De acordo com os cromatogramas obtidos a partir das análises por cromatografia gasosa acoplada em espectrometro de massas CG-EM das frações do extrato metanol dos galhos de *P. hebetatum*, a espécie tem como constituintes predominantes, o Isoeugenol, *p*-Vinilguaiacol, Metoxieugenol e a Escopoletina.

O isoeugenol apresenta inúmeras atividades farmacológicas como antiviral, antiúlcera, antidiabético, afrodisíaco, antioxidante, antitumoral, anestésico e anti-inflamatório, antimicrobiano e inseticida. (TAJUDDIN et al. 2004; CHAIEB et al. 2007; SANTIN et al, 2011).

O óleo de cravo da Índia, rico em isoeugenol, apresentou acentuada atividade antimicrobiana quando testado para os micro-organismos *S. aureus*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* (diminuindo significativamente a taxa de crescimento) e *S. epidermidis*. (SCHERER et al, 2009). O óleo também apresentou atividade contra 26 cepas de *S. epidermidis* isoladas de fluidos de diálise e mostrou-se efetivo, de maneira geral, contra bactérias Gram-positivas e Gram negativas (CHAIEB et al. 2007).

Outro composto importante identificado na espécie em estudo é o guaiacol, que derivou do *p*-vinilguaiacol, também identificado. O guaiacol, inicialmente utilizado como expectorante, originou a guaifenesina, o seu éter glicérico, um dos fármacos de maior utilização como expectorante atualmente (SIMÕES, 2007). Também está, juntamente com glicose-oxidase e lactoperoxidase, presente na fórmula do Flaminol<sup>®</sup>, medicamento capaz de inibir uma vasta gama de bactérias (COOPER, 2013).

As cumarinas coumarana, 5-hidroxi-escopoletina, 4,7-diidroxi-6-metoxicromam-2-ona e a escopoletina, identificadas na espécie, apresentam as maiores porcentagens de áreas relativas, com isso pode-se sugerir que *Protium hebetatum* é potencial fonte de cumarinas, que possuem uma ampla gama de aplicações industriais, incluindo indústria farmacêutica, como salientado ao longo do texto.

## 6. CONCLUSÃO

O presente trabalho foi pioneiro na avaliação da atividade antibacteriana de *Protium hebetatum*. Ficou claro o potencial antibacteriano da espécie, apesar de não ser expressivo em relação a dados de outras espécies encontrados na literatura. Entretanto, merece destaque sua atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, devido ao impacto desses micro-organismos na Saúde Pública, estando implicados na etiologia de vários distúrbios gastrointestinais de alta prevalência.

Por meio de cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada preparativa e análises por cromatografia gasosa acoplada em espectrômetro de massas (CG-EM), foram isolados os triterpenos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina e os esteroides estigmasterol e sitosterol, e identificada a cumarina escopoletina, que estão entre as substâncias responsáveis pela atividade antibacteriana de *P. hebetatum* contra os micro-organismos testados neste estudo. Entretanto, os resultados indicam que, de forma geral, o extrato metanol dos galhos, que contém a mistura dessas substâncias, é mais ativo que as amostras obtidas do seu fracionamento, sugerindo que essa atividade se deve a uma ação sinérgica desses compostos.

Ainda empregando a análise por CG-EM, foi possível identificar isoeugenol, *p*-vinilguaiacol, metoxieugenol, coumarana, 5-hidroxi-escopoletina, 4,7-diidroxi-6-metoxicromam-2-ona, piperonal, escoparona, o-guaiacol, espatulenol, siringol e antiarol, todas identificadas pela primeira vez nessa espécie, indicando que a mesma é rica em substâncias de interesse industrial, visto que são amplamente utilizadas no setor farmacêutico, alimentício, de higiene, cosméticos e agrônômicos.

Como proposto, esse estudo não isolou e identificou todos os compostos presentes na espécie, mantendo seu foco na identificação/isolamento de substâncias com atividade antibacteriana. Os resultados obtidos, principalmente aqueles relativos ao isolamento e identificação de substâncias, motivam a continuidade de estudos com a espécie, por exemplo, com foco nas atividades analgésica e anti-inflamatória, dado a presença de cumarinas, triterpenos e flavonoides, bem como encoraja estudos com outras espécies do gênero *Protium*, que ainda são pouco investigadas cientificamente.

## REFERÊNCIAS

- ACEDO, J. Z.; REYES, T. C.; RODRIGUEZ, E. B. Health-Promoting lipids from Purslane (*Portulaca oleracea* L.): Isolation, Characterization, Quantification and *In Vivo* Assay of Angiogenic Activity. **Philipp Agric Scientist**, v. 95, n. 4, p. 327–334, 2012.
- ALBERNAZ, L.C.; DE PAULA, J.E.; ROMERO, G.A.S.; SILVA, M.R.R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L.S. Investigation of plants extracts in tradicional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 116-121, 2010.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.
- ALVES, T. M. Et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-73, 2000.
- ALVES, T. M. Polygodial, the fungitoxic component from the Brazilian medicinal plant *Polygonum punctatum*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 831-833, 2001.
- AMARAL, I.L.; MATOS F.D.A.; LIMA J. Composição florística e estrutural de um hectare de floresta densa de terra firme no Rio Uatumã, Amazônia, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 30, p. 377 - 392, 2000.
- ARAGÃO G.F; CARNEIRO L.M.V.; JUNIOR A.P.F.; VIEIRA L.C.; BANDEIRA P.N.; LEMOS T.L.G.; VIANA G.S.B. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl) March. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 85, p. 827–834, 2007.
- ARDURA, M.I. *Staphylococcus aureus*: Vieja bacteria con nuevos trucos. **Rev. Chil. Infect.** v. 26, n. 5, p. 401-402, 2009.
- ARISAWA, M.; KINGHORN, A.D.; CORDELL, G.A.; FARNSWORT, N.R. Plant anticancer agents 6 $\alpha$ -Seneciolyoxychapparrin, a new antileukemic quassinoid from *Simaba multiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 46, p. 218-221, 1983.
- BALÉE, W. **A etnobotânica quantitativa dos índios Tembé (Rio Gurupi, Pará)**. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: Botânica v. 1, p. 29 – 50, 1987.
- BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O.D.L.; TREVISAN, M.T.S.; LEMOS, T.L.G. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. **Química Nova**, v.25, n.6, p. 1078-1080, 2002.
- BARBOSA-FILHO J.M.; MEDEIROS K.C.P.; DINIZ M.F.F.M.; BATISTA L.M.; ATHAYDE-FILHO P.F.; SILVA M.S.; CUNHA E.V.L.; ALMEIDA J.R.G.S.;

QUINTANS-JÚNIOR L.J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 16, p 258-285, 2006.

BARBOSA-FILHO J.M.; NASCIMENTO-JÚNIOR F.A.; TOMAZ A.C.A.; ATHAYDE-FILHO P.F.; SILVA M.S.; CUNHA E.V.L.; SOUZA M.F.V.; BATISTA L.M.; DINIZ M.F.F.M. Natural products with antileprotic activity. **Rev. Bras. Farmacognosia** v. 17, p 141- 148, 2007.

BENOIT, S. R.; ELLINGSON, K.D.; WATERMAN, S.H.; PEARSON, M. L. Antimicrobial resistance in eight US hospitals along the US-Mexico border, 2000-2006. *Epidemiol Infect*, v. 17, 2013.

CARNEIRO, V. M. C. **Composição Florística e Análise Estrutural da Floresta Primária de Terra Firme na Bacia do Rio Cuieiras, Manaus – AM**. 2004. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 2004.

CHAIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A.B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae). **Phytother Res**. v. 21, p. 501, 2007.

CHOMA, I.M.; GRZELAK, E.M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**. 1218, p. 2684–2691, 2011.

CITÓ, A.M.G.L.; SOUZA, A.A.; LOPES, J.A.D.; CHAVES, M.H. Identificação de constituintes voláteis de folhas e frutos de *Protium heptaphyllum* Aubl March. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.8, n.4, p.4-7, 2006.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, 2004.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document M7-A6 (ISBN 1- 56238-486-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898 USA. 2009.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; 88 Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). CCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. 2009.

COATES, A. R. M.; HU, Y.; BR. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 1147- 1154, 2007. COLOMA, A. G.; BALBOA, C. L.; REINA, O. S. M.; FRAGA, B. M. Triterpene-based plant defenses. **Phytochem Ver**, v. 10, p. 245-260, 2011.

COOPER R. A. Inhibition of biofilms by glucose oxidase, lactoperoxidase and guaiacol: the active antibacterial component in an enzyme alginate gel. **International Wound Journal**, v. 10, 2013.

CORRÊA, P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro. Imprensa Nacional. Ministério da Agricultura, v. 1, p. 82, 1973.

COSTA, A. F. **Farmacognosia: Farmacognosia experimental**. 3.ed., v. 3. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

COSTA, T.O.G.; ALMEIDA R.A.; KOOLEN H.H.F.; SILVA, F.M.A.; PINTO, A.C. Constituintes químicos do caule de *Protium hebetatum* (Burseraceae). **Acta Amazônica**. v. 42(4), p 557 – 560, 2012.

COTRAN, R.; KUMAR, S.; COLLINS, V.; ROBBINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

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

DALY, D. C. A. Taxonomic Revision of *Protium* (Burseraceae) in Eastern Amazonia and the Guianas. **City University of New York**. New York, 1987.

DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO, C.; MUNOZ, V.; RUIZ, G.; SAUVAINA, M. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evolution of antimalarial activity of plants used by Tacana Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p.91-98, 2001.

DÍAZ, I.E.C.; FRANA, S.A.; PACIENCIA, M.; SUFFREDINI, I.S. Estudo comparativo da presença de triterpenos pentacíclicos em resinas em espécies do gênero *Protium* da família Burseraceae. **4º Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas**, 2011.

DINIZ, K. S.; SCUDELLER V. V. **Estrutura Fitossociológica de uma Floresta de Terra Firme na Amazônia Central**. Manaus: Editora INPA, p. 155-167, 2005.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B.; Mecanismos de resistência a antibióticos em bactérias: Aspectos bioquímicos e genéticos. **Food Technol. Biotechnol**, v. 46, p. 11 – 21, 2008.

FREITAS J.G.; CAMARA C.A.; MORAES M.M.; SILVA H.C. Volatile constituents of two species of *Protium* from the Atlantic rainforest in the state of Pernambuco, Brazil. **Natural Product Communications**, v. 6 (11): 1727-30, 2011.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELÖV, A.; KUHN, I.; MCKENZIE, D.; MÖLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 63-73, 2002.

GUDASI, K. B.; PATIL, M. S.; VADAVI, R. S. Synthesis, characterization of copper(II), cobalt(II), nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes of [7-hydroxy 4-methyl-8-coumarinyl]glycine and a comparative study of their microbial activities. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 43, 2008.

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

HOLANDA PINTO S.A.; PINTO L.M.; CUNHA G.M.; CHAVES M.H.; SANTOS F.A.; RAO V.S. Anti-inflammatory effect of alpha, beta-amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. **Inflammopharmacology**, 16, p 48–52, 2008.

IWATSUKI, K.; YAMASAKI, O.; MORIZANE, S.; OONO, T. *Staphylococcal cutaneous* infections: invasion, evasion and aggression. **Journal of Dermatological Science**, v. 42, p. 203-214, 2006.

JACQUEMIN, D.; PERPÈTE, E. A.; CIOFINI, I.; ADAMO, C. Simulation of Optical Properties in Dyes. **Acc. Chem. Res.**, v. 42, p. 326 – 334, 2009.

JOANA, S.; PEDRO, P.; ELSA, G.; FILOMENA, M. Is vancomycin MIC creep a world wide phenomenon Assessment of *S. aureus* vancomycin MIC in a tertiary university hospital. **BMC Research Notes**. v. 6, n. 65, 2013.

JUNG, J.-C.; PARK, O.-S.; Synthetic Approaches and Biological Activities of 4-Hydroxycoumarin Derivatives. **Molecules**, v. 14, p. 4790 - 4803, 2009.

LEFEVRE, F.; ROBE, P.; JARRIN, C.; GINOLHAC, A.; ZAGO, C.; AURIOL, D.; VOGEL, T. M.; SIMONET, P.; NALIN, R. Drugs from hidden bugs: their discovery via untapped resources. **Res. Microbiol.**, v. 159, p. 153, 2008.

LIANG, Z.; ZHANG, L.; LI, L.; LIU, J.; LI, H.; ZHANG, L.; CHEN, L.; CHENG, K.; ZHENG, M.; WEN, X.; ZHANG, P.; HAO, J.; GONG, Y.; ZHANG, X.; ZHU, X.; CHEN, J.; LIU, H.; JIANG, H.; LUO, C.; SUN, H. Identification of pentacyclic triterpenes derivatives as potent inhibitors against glycogen phosphorylase based on 3D-QSAR studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 2011-2021, 2011.

LIU, X.; COLE, J. M.; WADDELL, P. G.; LIN, T.-C.; RADIA, J.; ZEIDLER, A. Molecular origins of optoelectronic properties in coumarin dyes: toward designer solar cell and laser applications. **J. Phys. Chem. A**, v. 116, p. 727, 2012.

LUZHETSKYY, A.; PELZER, S.; BECHTHOLD, A. The future of natural products as a source of new antibiotics. **Curr. Opin. Investig. Drugs**. v. 08, p. 13, 2007.

MAHATO S.B.; SEN S. Advances in triterpenoid research. **Phytochemistry**, v. 44, p 1185-1236, 1997.

MAIA, R.M.; BARBOSA, P.R.; CRUZ, F.G.; ROQUE, N.F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): Caracterização em misturas binárias. **Química Nova**. v.23, n. 5, p. 623-626, 2000.

MARRA, R.A; BAR, K.; BEARMAN, G.M.L.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Systemic inflammatory response syndrome in adult patients with nosocomial bloodstream infection due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Infection**, v. 53, p. 30-35, 2006.

MARTINS, S. AMORIM, E. L. A.; SOBRINHO, T. P. J.; SARAIVA, A. M.; PISCIOTTANO, M. N. C.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 306– 311, 2013.

MATOS, F. J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MENDES, L.P.M.; MACIEL, K.M.; VIEIRA, A.B.R.; MENDONÇA, L.C.V.; SILVA, R.M.F.; ROLIM NETO, P.J.; BARBOSA, W.L.R; VIEIRA, J.M.S. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. v. 32, p. 121-125, 2011.

MOON Y.; JANG W. R.; YI, H. G.; PARK, I. S.; NAHM, C. H.; CHOI, J. W.; KIM, J.J.; HAN, S. B. *Klebsiella pneumoniae* associated extreme plasmacytosis. **Infect Chemother**, v. 45, 2013.

MUSA, M.A.; COOPERWOOD, J.S.; KHAN, M.O. A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer. **Curr. Med. Chem**, v. 15(26), 2664-79, 2008.

NUSSBAUM, F. V.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HÄBICH, D. Antibacterial natural products in medicinal chemistry--exodus or revival? **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 45, 2006.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

OLAECHEA, P.M.; INSAUSTIB, J.; BLANCOC, A.; LUQUED, P. Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales. **Medicina Intensiva**, v. 34, n. 4, p. 256– 267, 2010.

OLIVEIRA F.A.; VIERA-JUNIOR G.M.; CHAVES M.H.; ALMEIDA F.R.C.; FLORENCIO M.G.; LIMA R.C.P.; SILVA R.M.; SANTOS F.A.; RAO V.S.N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacol Res** v. 49, p 105-111, 2004.

OLIVEIRA, A. N.; AMARAL, I. L. Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 34, p. 21-34, 2004.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; SINTO, S. I. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. São Paulo: Sarvier, 2000.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OTUKI, M.F.; VIEIRA-LIMA, F.V.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, n. 1-3, p. 253-259, 2005.

PAGONA, G.; KATERINOPOULOS, H. E.; TAGMATARCHIS, N. Synthesis, characterization and photophysical properties of a carbon nanohorn-coumarin hybrid material. **Chem. Phys. Lett.**, v. 76, 2011.

PALOMBO, E.A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potencial application in the prevention and treatment of oral diseases. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-15, 2011.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2ed. São Paulo: Editora Atheneu. 325p, 2003.

PITTET, D. Infection control and quality health care in the new millenium. **American Journal of Infection Control**, v. 33, n. 5, p. 258-267, 2005.

PLOWDEN, J. C. **The ecology, management and marketing of non-timber forest products in the Alto Rio Guamá Indigenous Reserve (Eastern Brazilian Amazon)**. Ph.D. dissertation, Pennsylvania State University, State College, 2001.

RAMOS, M.F.S.; SIANI, A.C.; TAPPIN, M.R.R.; GUIMARÃES, A.C.; RIBEIRO, J.E.L.S. Essential oils from oleoresins of *Protium spp.* of the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 150, p. 383-387, 2000.

RESCHKE, A.; MARQUES, L.M.; MAYWORM, M.A.S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 67-70. 2007.

RIBEIRO, C.V.C. & KAPLAN, M.A.C. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em Angiospermae. **Química Nova** v. 25, p. 533-538, 2002.

SADER, H.S.; MENDES, E. R.; GALES, A. C.; JONES, R. N.; PFALLER, M. A.; ZOCCOLI, C.; SAMPAIO, J. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros – Resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. **J. Pneumol**, v. 27, n. 2, 2001.

SANTANA, A.I.; VILA, R.; ESPINOSA, A.; OLMEDO, D.; GUPTA, M.P.; CAÑIGUERAL, S. Composition and biological activity of essential oils from *Protium confusum*. **Natural Product Communications**. v. 4, n.10, p. 1401-1406, 2009.

SANTIN, J.R.; LEMOS, M.; KLEIN-JÚNIOR, L.C.; MACHADO, I.D.; COSTA, P.; de OLIVEIRA, A.P.; TILIA, C.; de SOUZA, J.P.; DE SOUZA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; DE ANDRADE, S.F. Naunyn Schmiedebergs Arch. **Pharmacol**. v. 149, 2011.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica**. v. 43. n. 6 ,2007

SANTOS, W. H.; SIQUEIRA, M. S.; SILVA-FILHO, L. C. Síntese de derivados 4-aril-3,4-di-hidrocumarínicos catalisada por NbCl<sub>5</sub>. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1303-1307, 2013.

SASAKI, C. M. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopáticas e Antimicrobianas das partes aéreas de Pterocaulon lorentzii Malme (Asteraceae)**. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2009.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Rev. Bras. Plantas Med**. v. 11, p. 442-449, 2009.

SETH, S. K.; MAITY, G. C.; KAR, T. Structural elucidation, Hirshfeld surface analysis and quantum mechanical study of para-nitro benzylidene methyl arjunolate. **Journal of Molecular Structure**, v. 1000, p. 120–126, 2011.

SIANI, A. C.; RAMOS, M.F.S.; MENEZES-DE-LIMA, O.JR.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNADEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R.O.A.; ROSAS, E.C.; SUSUNAGA, G.S.; GUIMARÃES, A.C.; ZOGHBI, M.G.B.; HENRIQUES, M.G.M. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, p. 57-69, 1999.

SIANI, A.C.; GARRIDO, I.S.; MONTEIRO, S.S.; CARVALHO, E.S.; RAMOS, M.F.S. *Protium icicariba* as a source of volatile essences. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 477-489, 2004.

SILVA, E.A.S. **Estudos dos óleos essenciais extraídos de resinas de espécies de *Protium spp.*** 2006. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) Faculdade de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

SILVA, J.R.A.S.; ZOGHBI, M.G.B.; PINTO, A.C.; GODOY, R.L.O.; AMARAL, A.C.F. Analysis of the hexane extracts from seven oleoresins of *Protium* species. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 4, p. 305-308, 2009.

SILVEIRA, L.M.S.; OLEA, R.S.G.; MESQUITA, J.S.; CRUZ, A.L.N.; MENDES, J.C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.** v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007.

SUSUNAGA, G.S.; SIANE, A.C.; PIZZOLATTI, M.G.; YUNES R.A.; MONAACHE F.D. Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. **Fitoterapia**, v. 72, p 709-711, 2001.

TADEG, H.; MOHAMMED, E.; ASRES, K.; GEBRE-MARIAM, T. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 168-175, 2005.

TAJUDDIN; S.A.; LATIF, A.; QASMI, I.A. Effect of 50% ethanolic extract of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry. (clove) on sexual behaviour of normal male rats. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 4, p.17, 2004.

TAKIZAWA, S.; PÉREZ-BOLÍVAR, C.; ANZENBACHER JR., P.; MURATA, S. Cationic Iridium Complexes Coordinated with Coumarin Dyes – Sensitizers for Visible-Light-Driven Hydrogen Generatio. **European Journal of Inorganic Chemistry**, 2012.

TAYLOR, P; ARSENAK, M; ABAD, M.J; FERNÁNDEZ A; MILANO; B; GONTO,R; RUIZ, M.C; FRAILE, S; TAYLOR, S; ESTRADA, O; MICHELANGELI, F. Screening of Venezuelan medicinal plant extracts for cytostatic and cytotoxic activity against tumor cell lines. **Phytotherapy research**, 2012.

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

THOMSON, J.; BOMONO, R.A. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria:  $\beta$ -lactams in peril. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 518-524. 2005.

- TORTORA, G; FUNKE, B.R.; CASE, C. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed. 2005.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. Sao Paulo: Atheneu, 2005.
- VALGAS, C. et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, p. 369-380, 2007.
- VARGHESE, A.; TICKTIN, T. Regional variation in non-timber forest product harvest strategies, trade, and ecological impacts: the case of black dammar (*Canarium strictum* Roxb.) use and conservation in the Nilgiri Biosphere Reserve. India. **Ecology and Society**, v. 13, p.11, 2008.
- VIEIRA, S.C.H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.
- WALSH, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. **Protein Science**. ASM Press: Washington, 2003.
- WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R.J.; SAND, C.; RENNIE, R.P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 140–146, 2008.
- WECKWERTH, P. H.; ZAPATA, R. O.; VIVAN, R. R.; TANOMARU, M. F.; MALIZA, A. G.; DUARTE, M. A. In Vitro Alkaline pH Resistance of *Enterococcus faecalis*. **Braz Dent. J.**, v. 24, p. 474-476, 2013.
- WOODFORD, N.; Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. **Clin. Infec. Microbiol.** v. 11, 2005.
- ZOGHBI, M.G.B.; SIQUEIRA, J.B.G.; WOLTER, E.L.A.; JÚNIOR, O.L.P. Constituintes químicos de *Protium paniculatum* (BURSERACEAE). **Acta Amazonica**, v. 23, p.187-189, 1993.

## 7. APÊNDICES

- FRAGMENTOGRAMAS DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM *P. hebetatum*

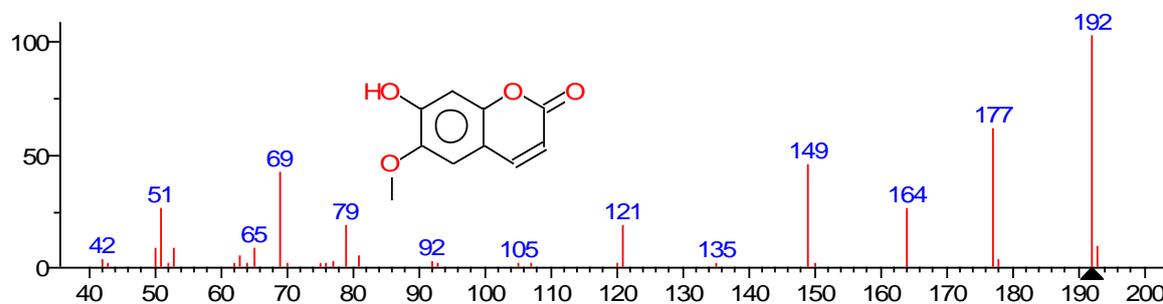


Figura 37. Fragmentograma do composto Escopoletina

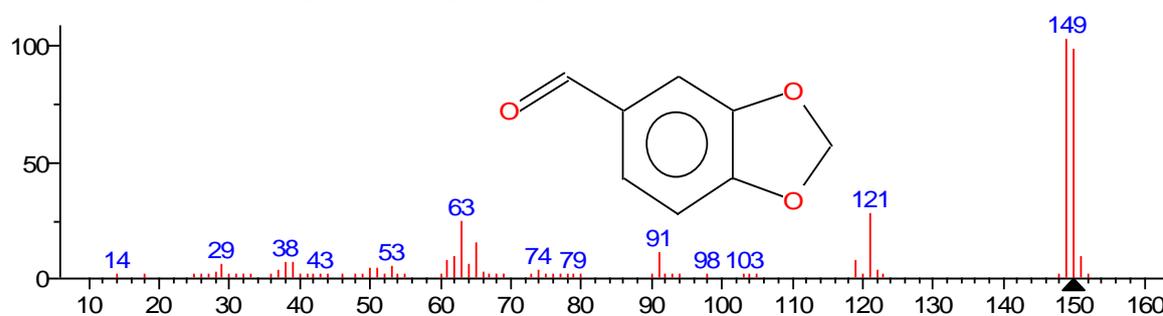


Figura 38. Fragmentograma do composto Piperonal

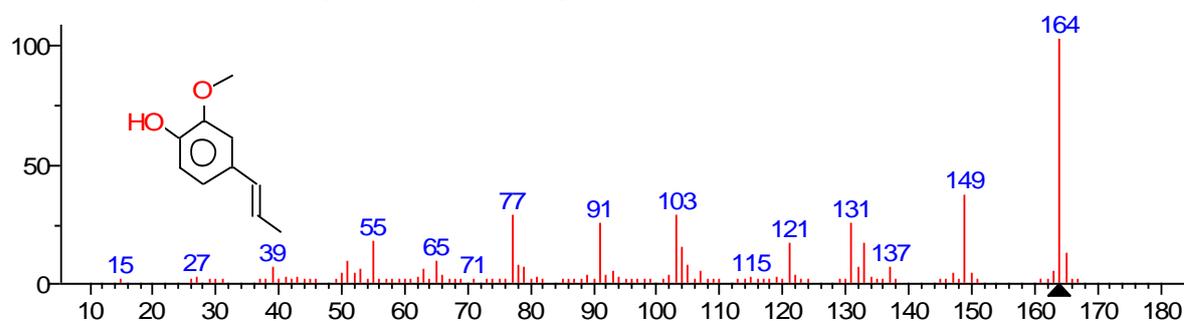


Figura 39. Fragmentograma do composto Isoeugenol

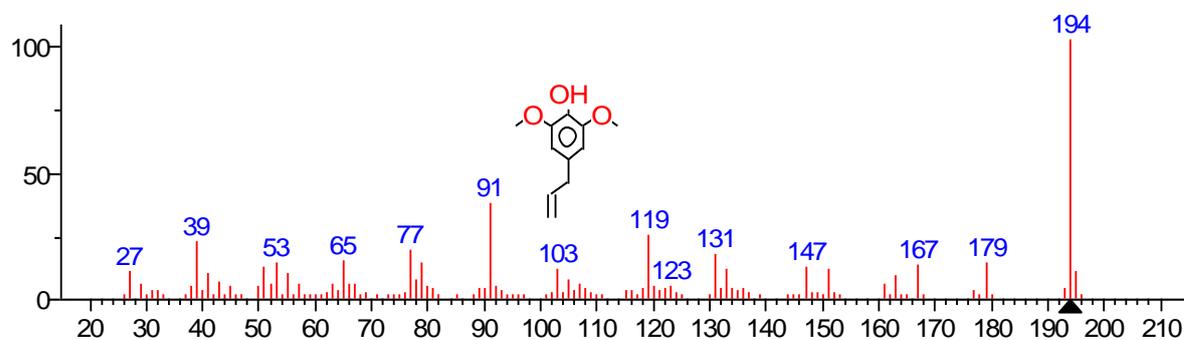


Figura 40. Fragmentograma do composto Metoxieugenol

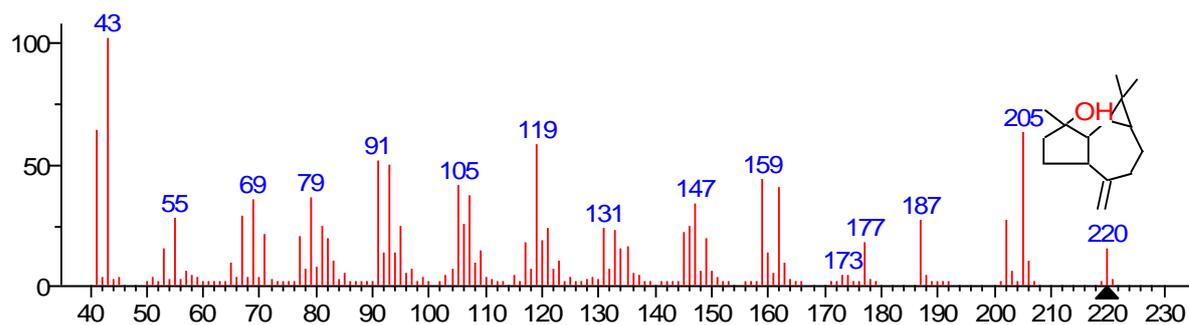


Figura 41. Fragmentograma do composto Espatulenol

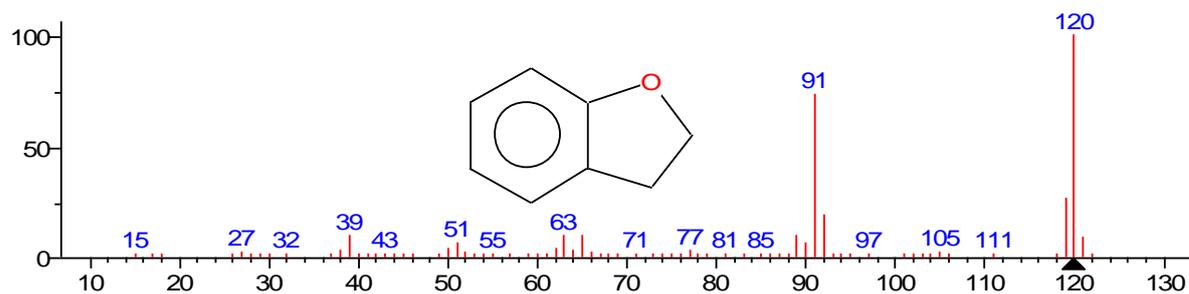


Figura 42. Fragmentograma do composto Coumarana

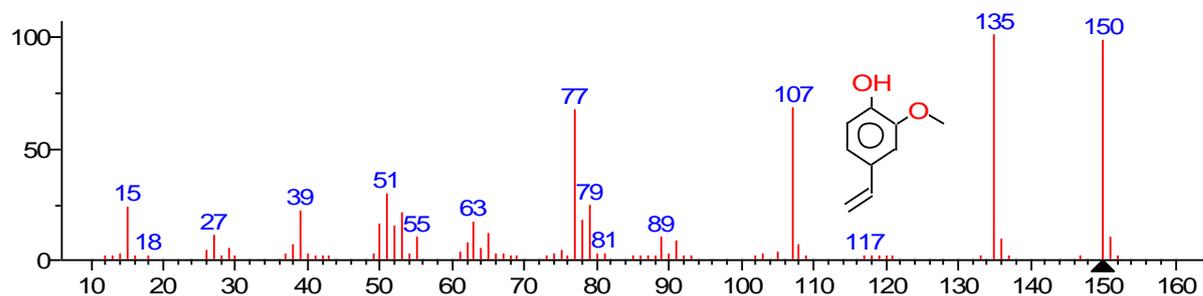


Figura 43. Fragmentograma do composto p-Vinilguaiacol

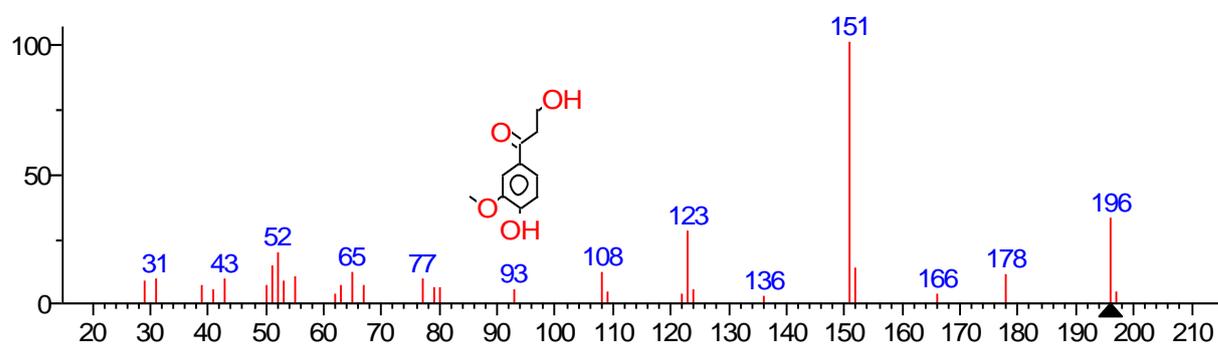


Figura 44. Fragmentograma do composto  $\beta$ -Hidroxiopropiovanillone

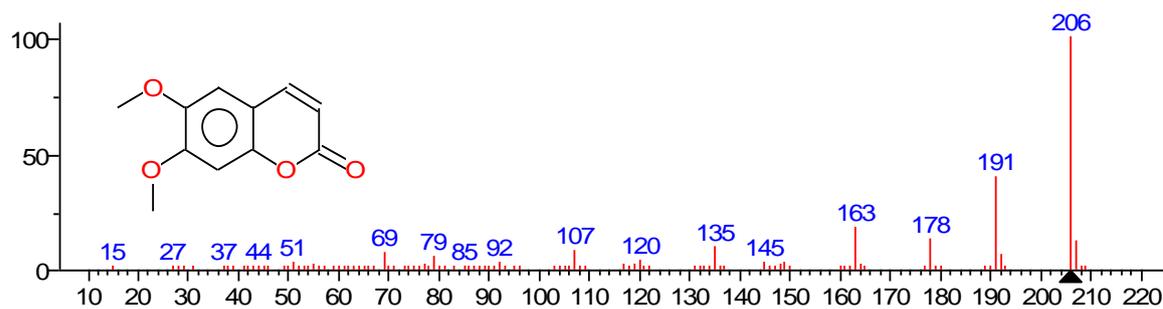


Figura 45. Fragmentograma do composto Escoparona

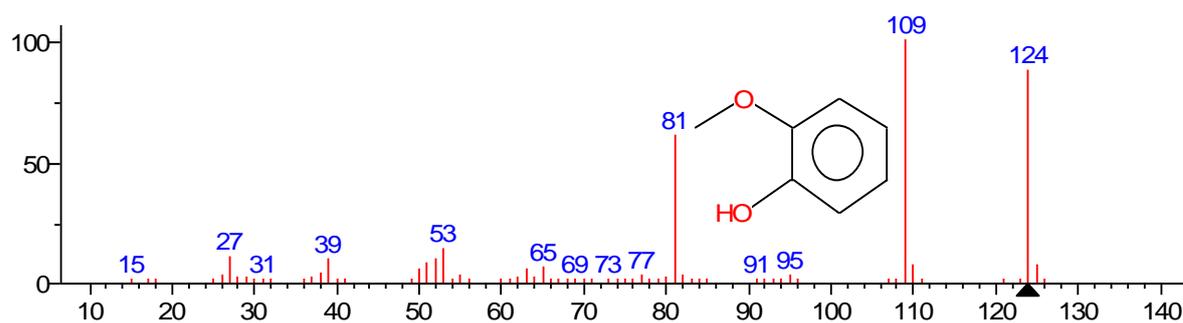


Figura 46. Fragmentograma do composto o- Guaiacol

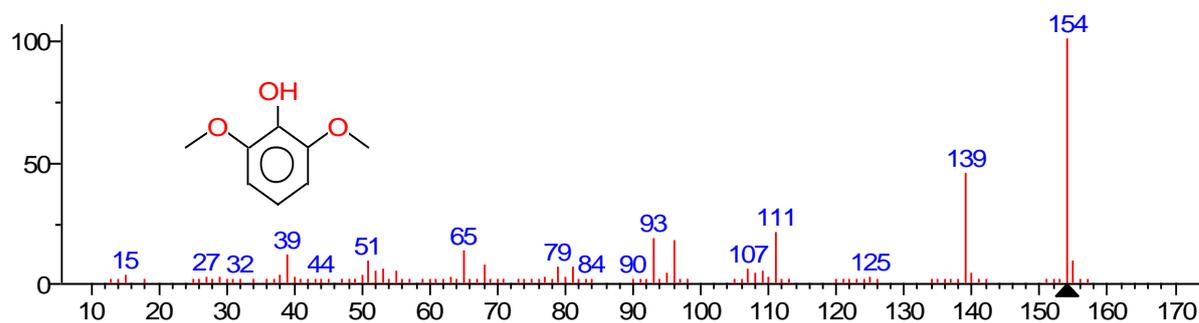


Figura 47. Fragmentograma do composto 2,6-Dimethoxyphenol (seringol)

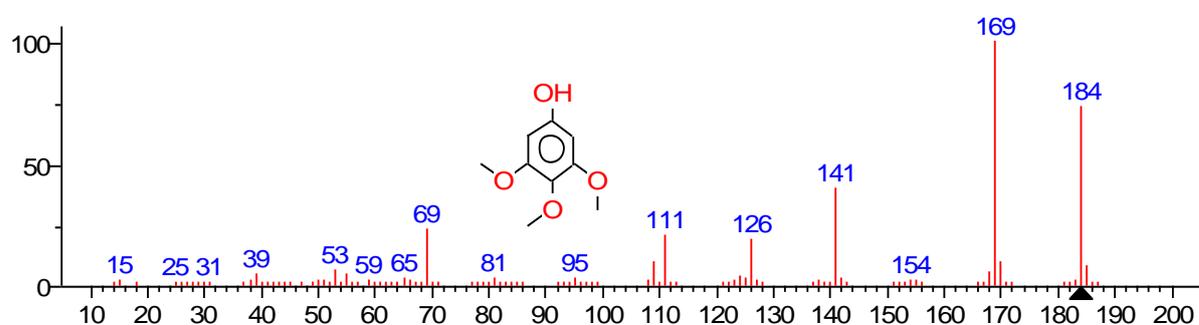


Figura 48. Fragmentograma do composto Antiarol

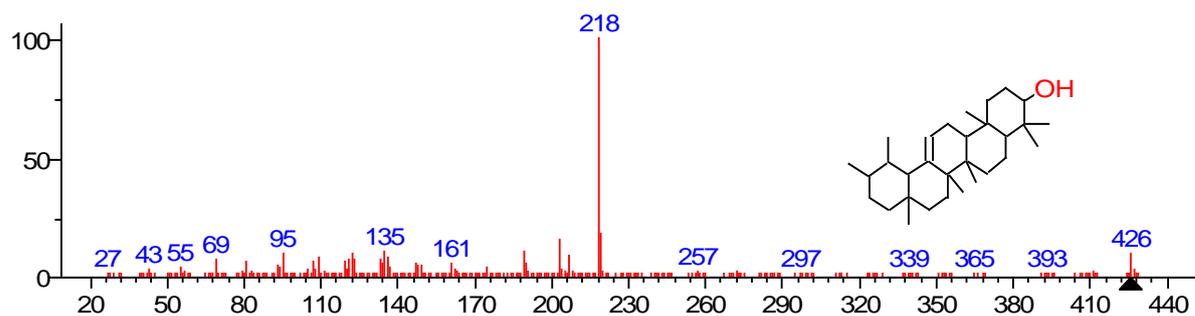
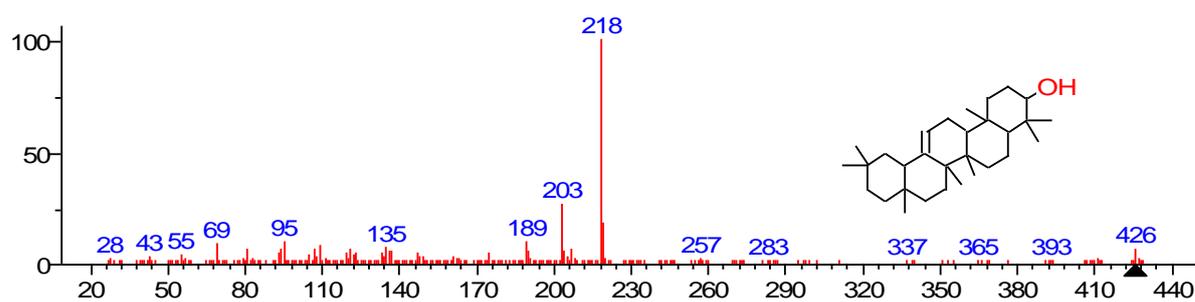
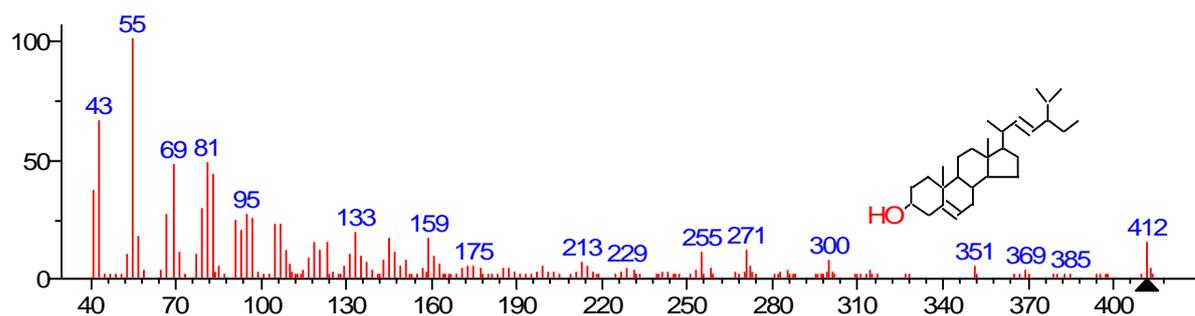
Figura 49. Fragmentograma do composto  $\alpha$ -amirinaFigura 50. Fragmentograma do composto  $\beta$ -amirina

Figura 51. Fragmentograma do composto Estigmasterol

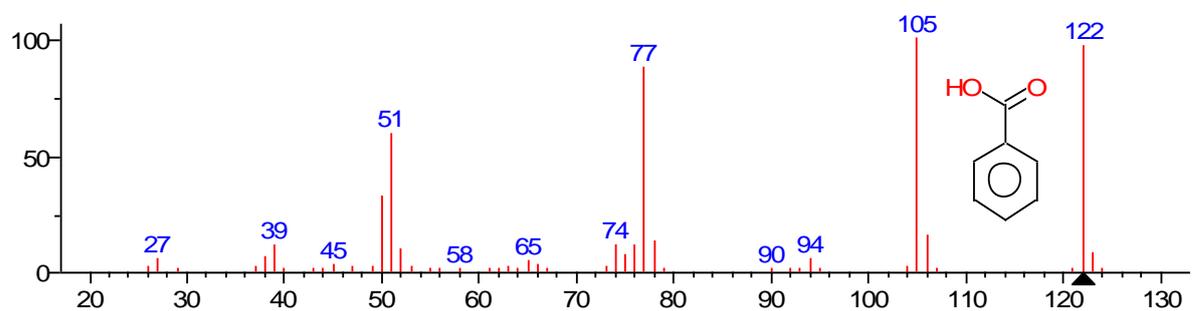


Figura 52. Fragmentograma do composto Ácido benzoico

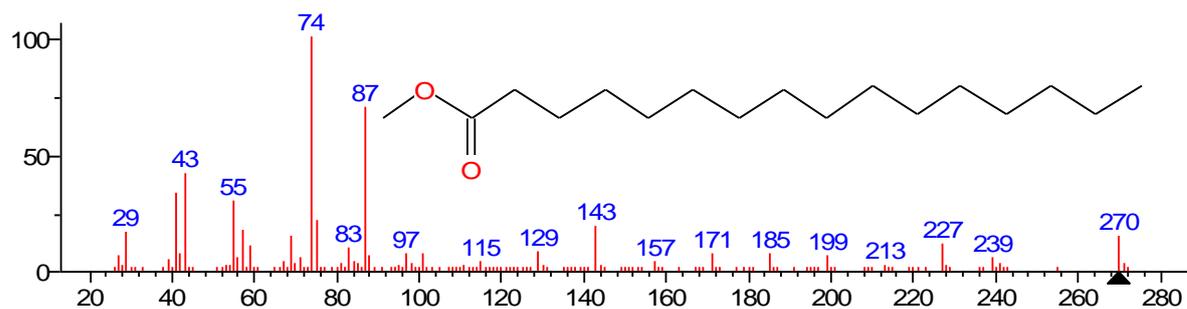


Figura 53. Fragmentograma do composto Hexadecanoato de metila

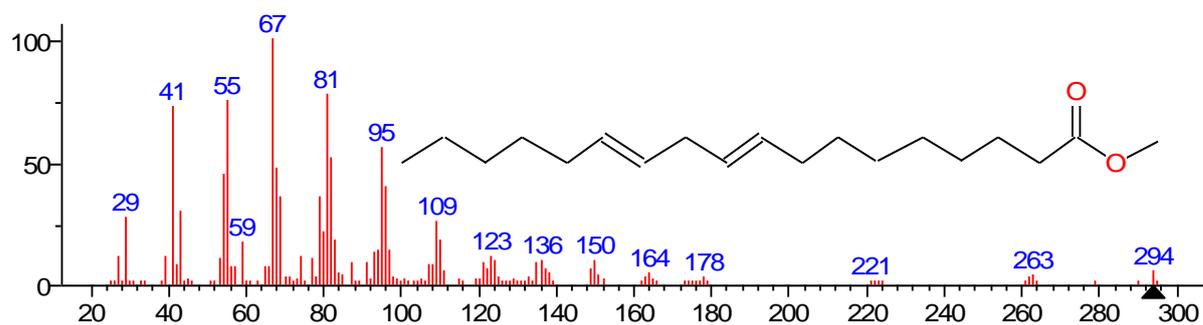


Figura 54. Fragmentograma do composto 9,12-octadecadienóico de metila

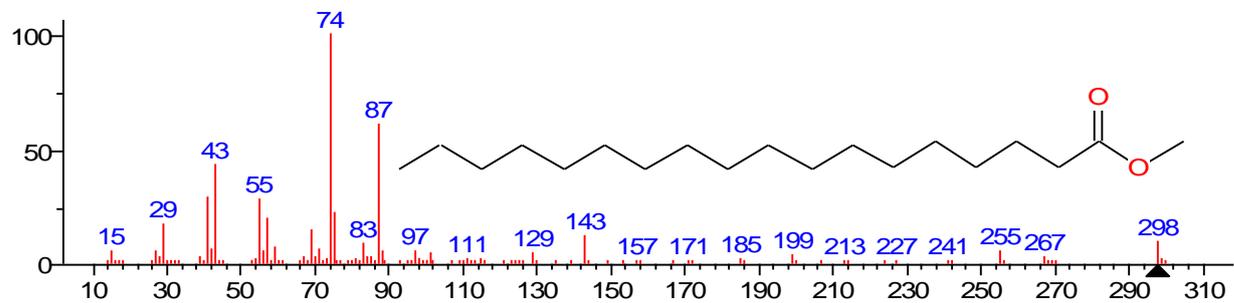


Figura 55. Fragmentograma do composto Ácido esteárico de metila