



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO QUÍMICO, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS VEGETAIS DE ESPÉCIES DO GÊNERO
MONSTERA FRENTE A BACTÉRIAS HOSPITALARES**

MÔNICA VANESSA MATOS MONTEIRO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção de grau de Mestre em Ciências.

MARÇO DE 2012

Mônica Vanessa Matos Monteiro

Título: Estudo Químico, Avaliação da Atividade Antioxidante e Antibacteriana de Extratos Vegetais de Espécies do Gênero *Monstera* Frente a Bactérias Hospitalares

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção de grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Professora Doutora Ivana Correa Ramos Leal

Co-orientador: Professor Doutor Rodrigo Octávio Mendonça Alves de Souza

Março de 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Matos Monteiro, Mônica Vanessa

Estudo Químico, Avaliação da Atividade Antioxidante e Antibacteriana de Extratos Vegetais de Espécies do Gênero *Monstera* Frente a Bactérias Hospitalares/

Mônica Vanessa Matos Monteiro-Rio de Janeiro: UFRJ/2012 .f.:127.; 29cm

Orientadores: Ivana Correa Ramos Leal e Rodrigo Octávio Mendonça Alves de Souza

Dissertação(mestrado)- UFRJ/ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012

Mônica Vanessa Matos Monteiro

Estudo Químico, Avaliação da Atividade Antioxidante e Antibacteriana de Extratos Vegetais de Espécies do Gênero *Monstera* Frente a Bactérias Hospitalares

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção de grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em:

Presidente, Professora Doutora Ivana Correa Ramos Leal
Universidade Federal do Rio de Janeiro – FF- Macaé

Professora Doutora Michelle Frazão Muzitano
Universidade Federal do Rio de Janeiro – FF- Macaé

Professor Doutora Denise Oliveira Guimarães
Universidade Federal do Rio de Janeiro – FF- Macaé

Professora Doutora Yraima Moura Lopes Cordeiro
Universidade Federal do Rio de Janeiro – FF

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei

A Deus, meus filhos João Vítor e
Luíz Felipe, meu marido Peterson
e meus pais Ademir e Silmar

Dedico esta dissertação.

Agradecimentos

Ao Meu Deus, maior responsável pela realização deste trabalho.

Aos meus filhos, João Vítor e Luíz Felipe, motivo pelo qual tenho forças para lutar e vencer e ao meu marido Peterson pelo apoio, amor e companherismo.

Aos meus amados pais, José Ademir e Silmar, pelas orações e por me ensinarem a primeiro buscar o reino de Deus, que as demais coisas me seriam acrescentadas.

À minha querida irmã, Silvia pela verdadeira amizade e alegria e aos meus sobrinhos Pedro Henrique e João Pedro pelo carinho e brincadeiras.

Ao meu cunhado Pedro, sogro Walter e sogra Mercedes pelas palavras de incentivo e ajuda.

Agradecimento especial a minha querida orientadora Ivana por ter sido mais que uma orientadora, mais uma grande amiga, por ter sempre acreditado que meus conhecimentos pudessem ir além, estando sempre disposta a me ensinar com sua reconhecida capacidade como pesquisadora, me desejando sempre o melhor e me ajudando a superar as dificuldades.

Ao meu orientador Rodrigo pela força e dedicação ao me orientar.

Ao professor Ricardo e à professora Naomi por me trazerem novos conhecimentos, e por fazerem me sentir super a vontade trabalhando em seu laboratório.

As minhas grandes amigas Michelle e Halliny, agradeço a Deus por ter colocado vocês na minha vida. Com os testes na micro, nos tornamos mais próximas. Amigas de fé, muito obrigada pelas palavras de incentivo e de apoio. Suas companhias, me ajudaram naqueles ensaios longos e cansativos que, se tornaram até divertidos (acreditem!).

Em especial aos meus amigos Michelle, Halliny, Ivaldo, Letícia, Karem e Jéssica, amigos que ocuparam espaço permanente no meu coração, por serem exemplo de humildade, força e capacidade. A professora Cássia Mônica Sakuragui pela ajuda na etapa inicial e fundamental do meu trabalho.

Aos amigos do lab.622 Felipe, Ingrid, Flávia, Jane, Giselda, Zé, Paulo, Leandro, Jonathan, Ana, Kelly e Ricardo, pela ajuda e companherismo.

Aos amigos do laboratório do Richard: Cris, Anne, Celso, Kássia, Michelle, Aline, Alda e Daniele. Obrigada também pela ajuda e palavras de apoio.

Agradeço à Prof.a Kátia Regina Netto dos Santos por ter me concedido espaço em seu laboratório, me permitindo realizar meu trabalho e aos demais amigos do Laboratório de Infecção Hospitalar do IMPPG/ UFRJ por todo apoio e simpatia.

A Prof. Kátia Costa de Carvalho Sabino e aos amigos da UERJ pela receptividade, me fazendo conhecer a Biologia celular e por toda dedicação.

A professora Ana Cláudia e aos amigos de PN/ Fiocruz pela amizade, solidariedade e apoio científico na etapa de conclusão. Sempre prontificados a me auxiliar, obrigada por dividirem seu espaço. Pena que foi por pouco tempo que tive o prazer de conviver com vocês.

As minhas amigas Patrícia e Aline, que me ajudaram com suas amizades.

A professora Thelma pela ajuda e apoio na etapa final do meu trabalho.

A todos os professores do programa de Ciências farmacêuticas e a CAPES pelo apoio financeiro.

“Senhor Jesus, muito Obrigada pelos amigos que ganhei, nesses dois anos. Que me ajudaram não só a obter conhecimentos científicos, mas me fizeram valorizar ainda mais as verdadeiras amizades.”

RESUMO

MATOS MONTEIRO, Mônica Vanessa. **Estudo Químico, Avaliação da Atividade Antioxidante e Antibacteriana de Extratos Vegetais de Espécies do Gênero *Monstera* Frente a Bactérias Hospitalares.** Rio de Janeiro, 2012. Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Monstera adansonii Schott. e *Monstera deliciosa* Liebm. pertencem a família Araceae, e são popularmente conhecidas como “planta de cinco furos” e “costela de Adão”, respectivamente. Ocorrem geralmente em lugares úmidos e sombreados, mais amplamente na América do Sul, já tendo sido registradas em quase todo o Brasil. Neste estudo, buscou-se atribuir à estas espécies evidências farmacológicas quanto ao aspecto das atividades antioxidante e antibacteriana, buscando identificar as substâncias ativas responsáveis por estes potenciais biológicos. A partir do extrato etanólico bruto foram obtidos os extratos hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e água pela técnica de partição líquido-líquido. A análise do perfil químico por CG-EM das sub-frações provenientes do extrato em hexano e diclorometano derivadas de *M. adansonii* e *M. deliciosa* permitiu a identificação dos ácidos graxos palmítico, linoléico e linolênico como constituintes químicos majoritários, tendo sido os dois primeiros devidamente quantificados pela construção de curvas de calibração utilizando os padrões correspondentes. A partir de sub-frações obtidas do fracionamento da fração em acetato de etila de *M. deliciosa* por SPE, verificou-se a presença de flavonóides do tipo flavona através da análise por CLAE-DAD. Os extratos de *M. adansonii* apresentaram atividade antibacteriana pelo método de diluição em ágar frente a amostras clínicas e padrão de *Acinetobacter baumannii* destacando-se, o extrato hexânico, que também apresentou atividade frente a amostras clínicas e padrão de *Staphylococcus aureus*, além de amostras padrão de *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, e *S. hominis* à 512 µg/mL. A partir de sub-frações obtidas do fracionameto da fração hexânica de *M. adansonii* a sub-fração HXDL₅₀. se destacou por apresentar atividade antibacteriana (MIC1024µg/ml) Esta fração apresentou um efeito bactericida frente a amostra padrão ATCC de *S. aureus*, tendo exercido ação satisfatória sobre a curva de crescimento e morte do referido micro-organismo. A fração em acetato de etila de *M. deliciosa* apresentou importante atividade antioxidante (EC₅₀= 62,80µg/ml) pelo método do DPPH comparável ao padrão EGB761 de *G. biloba* (EC₅₀= 38,91µg/ml). Pelo método ORAC de avaliação da atividade antioxidante, os extratos em acetato de etila, butanólico e aquoso de *M. deliciosa* apresentaram atividade antioxidante satisfatória comparada ao padrão Trolox, o que parece estar relacionado com os flavonóides presentes na primeira. O extrato em acetato de etila de *M. deliciosa* e os extratos hexânico e diclorometano de *M. adansonii* apresentaram significativa capacidade quelante do íon ferroso, em todas as concentrações testadas em comparação ao controle (quercetina), o que pode estar relacionado com a atividade antibacteriana dos mesmos. A fração HX e HXDL50 apresentou efeito citotóxico moderado (2048 e 1024µg/ml) e nenhum sinal de toxicidade aguda.

ABSTRACT

MATOS MONTEIRO, Mônica Vanessa. **Estudo Químico, Avaliação da Atividade Antioxidante e Antibacteriana de Extratos Vegetais de Espécies do Gênero *Monstera* Frente a Bactérias Hospitalares.** Rio de Janeiro, 2012. Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Monstera adansonii Schott. and *Monstera deliciosa* Liebm. belong to the Araceae family and are popularly known as "five holes plant" and "Adam's rib," respectively. They generally occur in moist and shady places, more widely in South America, having been recorded in almost all of Brazil area. In this study, we attempted to assign to these species pharmacological evidence regarding the appearance of antioxidant and antibacterial activities, seeking to identify the active constituents responsible for these biological potential. From the crude ethanolic extract it was obtained the hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and water extracts by the liquid-liquid partition technique. The chemical profile analysis by GC-MS of the hexane and dichloromethane fractions derived from *M. adansonii* and *M. deliciosa* allowed the identification of palmitic, linoleic and linolenic fatty acids as major chemical constituents. The first two had been adequately quantified by the construction of calibration curves by using the corresponding standards. From sub-fractions obtained from fractionation of the ethyl acetate fraction of *M. deliciosa* by SPE there were identified the presence of flavone type flavonoids by HPLC-DAD analysis. The extracts of *M. adansonii* showed antibacterial activity by the Ágar dilution method against clinical and pattern strains of *Acinetobacter baumannii*, specially the hexane extract, which also showed activity against clinical and standard samples of *Staphylococcus aureus*, and standard strains of *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, and *S. hominis* at 512 mg / mL. From sub-fractions obtained from fracionameto of the hexane fraction of *M. adansonii* HXDL50 sub-fraction. stood out for having antibacterial activity (MIC1024µg/ml) This fraction showed a bactericidal effect against an ATCC standard strain of *S. aureus*, having held a satisfactory action on the growth and death curves of this micro-organism, which suggested being a synergistic effect of the fatty acids. The ethyl acetate fraction of *M. deliciosa* presented significant antioxidant activity ($EC_{50} = 62,80 \mu\text{g/mL}$) comparable to the standard EGb761 *G. biloba* ($EC_{50} = 38,91 \mu\text{g/mL}$) by the DPPH method. By the ORAC method of antioxidant activity evaluation, the ethyl acetate, butanol and aqueous extracts of *M. deliciosa* exhibited satisfactory antioxidant activity compared to the standard Trolox, which seems to be related to the flavonoids presented in the first one. The ethyl acetate extract of *M. deliciosa* and, hexane and dichloromethane extracts of *M. adansonii* showed significant ferrous ion chelating ability at all concentrations tested compared to the control (quercetin), which seems to be related to the antibacterial activity of these fractions. The fraction of HX and HXDL50 showed moderate cytotoxic effect (2048 and 1024µg/ml) and no sign of acute toxicity.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos ácidos palmítico, linoléico e esteárico presentes no óleo das sementes de <i>Arum italicum</i> Miller e <i>Dracunculus vulgaris</i> Schott.	25
Figura 2. Estrutura química dos ácidos dos tipos n-fenilpropanóico e n-fenildecenóico em folhas de <i>Trichilia claussenii</i> . (Chernenko et al., 2005)	26
Figura 3. Partes aéreas das espécies <i>M.adansonii</i> Schott. e <i>M. deliciosa</i> Liebm.	28
Figura 4. Partes da planta do gênero <i>Monstera</i>	28
Figura 5. Primeiras substâncias com atividade antibacteriana isoladas de espécies vegetais	30
Figura 6. Substâncias naturais antimicrobianas isoladas de diferentes espécies vegetais.	31
Figura 7. Estrutura química do ácido 2-oxo-populifólico e da isoliquiritigenina.	32
Figura 8. Patógenos mais isolados de sítios de infecções hospitalares no Brasil (MARRA et al., 2011).	38
Figura 9. Biossíntese de ácidos graxos e as enzimas-chave no processo (CARBALLEIRA, 2008).	40
Figura 10. Principais grupos de flavonóides (RIJKE, et al., 2006).	42
Figura 11. Metodologia referente à partição líquido-líquido com diferentes solventes (LEAL, et al., 2011).	47
Figura 12. Reação de derivatização (silação)	51
Figura 13. Curva de calibração do ácido palmítico	53
Figura 14. Curva de calibração do ácido linoléico	53
Figura 15. Reação de redução do DPPH por espécies antioxidantes (Molyneux, 2004)	65
Figura 16. Cromatograma obtido pela técnica por CG-EM da fração HXDL ₅₀ .	76
Figura 17. Espectro de massas referente ao sinal com tempo de retenção de 17,59 minutos (Ácido palmítico) obtido a partir da análise da fração HXDL ₅₀ por CG-EM.	76
Figura 18. Espectro de massas referente ao sinal com tempo de	76

retenção de 19,25 minutos (Ácido linolêico) obtido a partir da análise da fração HXDL ₅₀ , por CG-EM.	
Figura 19. Espectro de massas referente ao sinal com tempo de retenção de 19,33 minutos. (Ácido linolênico) obtido a partir da análise da fração HXDL ₅₀ CG-EM.	77
Figura 20. Cromatograma da Fração DL ₁₀₀ obtido pela técnica de CG-EM.	78
Figura 21. Espectro de massas referente ao sinal com tempo de retenção de 18,08 minutos (Ácido palmítico) obtido a partir da análise da fração DL ₁₀₀ por CG-EM.	78
Figura 22. Espectro de massas referente ao sinal com tempo de retenção de 23,89 minutos (Esteróide) obtido a partir da análise da fração DL ₁₀₀ por CG-EM.	78
Figura 23. Espectro de massas referente ao sinal com tempo de retenção de 24,566 minutos (ácido sebácico) obtido a partir da análise da fração DL ₁₀₀ por CG-EM.	79
Figura 24. Cromatograma da fração DLAC ₅₀ obtido pela técnica por CG-EM.	79
Figura 25. Espectro de massas referente ao sinal com tempo de retenção de 18,09 minutos (ácido palmítico) obtido a partir da análise da fração por CG-EM.	79
Figura 26. Percetual de área relativa dos ácidos palmítico, linoléico e linolênico na sub- fração HXDL ₅₀ (<i>Monstera deliciosa</i>) X HXDL ₅₀ (<i>Monstera adansonii</i>)	81
Figura 27. Estrutura química do 2 -O-Glicerol- alfa-d- alatopiranosídeo.	84
Figura 28. Cromatograma referente aos sinais com TR que variam de 4,8 a 16,9 minutos (flavonóides) obtido a partir da análise da fração 11 por HPLC.	86
Figura 29. Espectro de UV referentes aos picos 3 e 4 com TR de 14,8 e 14,9 min respectivamente (flavonóides), obtidos a partir da análise da sub-fração 11.	87
Figuras 30. Espectro de UV referentes aos picos 5 e 6 com TR de 15,3 e 15,5 min respectivamente (flavonóides), obtidos a partir da análise da sub-fração 11.	87
Figura 31. Espectro de UV referentes aos picos 7 e 8 com TR de 15,8 e 16,0 min respectivamente (flavonóides), obtidos a partir da análise da sub-fração 11.	87
Figura 32. Espectro de UV referente ao pico 9 com TR de 16,3 min (flavonóide), obtido a partir da análise da sub-fração 11.	88
Figura 33. Estrutura básica do esqueleto flavona.	89
Figura 34. Curva de crescimento bacteriano na presença da fração	95

HXDL ₅₀	
Figura 35. Curva de morte bacteriana na presença da fração HxDL ₅₀	96
Figura 36. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos obtidos de MD pelo método do DPPH.	98
Figura 37. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos obtidos de MA pelo método do DPPH.	98
Figura 38. Avaliação do potencial antioxidante do extrato em acetato de etila de MD pelo método DPPH	99
Figura 39. Avaliação do potencial antioxidante do extrato em acetato de etila de MD pelo método ORAC	101
Figura 40. Avaliação do potencial antioxidante do extrato butanólico de MD pelo método ORAC.	102
Figura 41. Avaliação do potencial antioxidante dos extrato aquoso de MD pelo método ORAC.	102
Figura 42. Capacidade quelante de íons ferrosos (%) dos extratos MD, em comparação com os padrões quercetina e EDTA-Na ₂ .	104
Figura 43. Capacidade quelante de íons ferrosos (%) dos extratos de MA, em comparação com os padrões quercetina e EDTA-Na ₂ .	104
Figura 44. Avaliação do potencial citotóxico in-vitro do extrato HX e da sub-fração HXDL ₅₀ utilizando células BCS-40 (epitélio de rim de macaco verde africano).	107

ÍNDICE DE TABELAS:

Tabela 1: Características da filtração à vácuo do extrato hexânico de <i>Monstera deliciosa</i> Liebm.	48
Tabela 2a: Características da filtração à vácuo do extrato hexânico de <i>Monstera adansonii</i> Schott (1ª).	49
Tabela 3: Características da filtração à vácuo do extrato em diclorometano de <i>Monstera adansonii</i> Schott.	50
Tabela 4: Sub-frações obtidas do extrato em acetato de etila de MD através da extração por SPE.	51
Tabela 5: Rampa de temperatura por CG-EM para análise das frações apolares.	52
Tabela 6: Condições pelo método gradiente por CLAE para análise das sub-frações provenientes do extrato acetato de etila de MD.	54
Tabela 7: Características das amostras clínicas e 2 amostras de referência de <i>Staphylococcus</i> spp. utilizadas no presente estudo.	55
Tabela 8: Características de outras amostras de referência utilizadas no presente estudo.	56
Tabela 9: Características das amostras clínicas e 1 amostra de referência de <i>Acinetobacter baumannii</i> utilizadas no presente estudo.	57
Tabela 10: Rendimentos dos extratos vegetais obtidos pela partição líquido-líquido.	71
Tabela 11: Características da filtração à vácuo do extrato hexânico de <i>Monstera deliciosa</i> Liebm.	72
Tabela 12a: Características da filtração à vácuo do extrato hexânico de <i>Monstera adansonii</i> Schott (1ª)	72
Tabela 12b: Características da filtração à vácuo do extrato hexânico de <i>Monstera adansonii</i> Schott (2ª).	73
Tabela 13: Características da filtração à vácuo do extrato em diclorometano de <i>Monstera adansonii</i> Schott.	73
Tabela 14: Rendimento das sub-frações obtidas do extrato em acetato de etila de MD através da extração por SPE.	74
Tabela 15: Quantificação dos ácidos graxos presentes na sub-fração HXDL ₅₀ .	82
Tabela 16: Análise química das sub-frações do extrato em diclorometano de <i>Monstera adansonii</i> .	83
Tabela 17: Tempo de retenção e espectro de UV dos flavonóides presentes na sub- fração 11.	86

Tabela 18: Relação de referências descrevendo espectro de UV de flavonas.	88
Tabela 19: Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de MA frente ao total de amostras clínicas e padrão de <i>Acinetobacter baumannii</i> .	91
Tabela 20: Avaliação da atividade antibacteriana das sub-frações obtidas da filtração à vácuo do extrato diclorometânico de <i>Monstera adansonii</i> Schott.	94
Tabela 21: Valores de CE ₅₀ dos extratos derivados de MD e MA referente à atividade antioxidante pelo método do DPPH.	97
Tabela 22: Percentual médio das atividades antioxidantes (AAO%) das frações MD, comparando com o padrão positivo Ginkgo biloba EGb 761®.	99

LISTA de ABREVIATURAS

AAPH - 2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride

ACET - Acetato de Etila

AC₁₀₀ - Acetato de Etila 100%

ACME₅₀ – Acetato de Etila / Metanol 50%

AQ – Aquoso

ATCC- American Type Culture Collection

BCS-40- Epitélio de Rim de Macaco Verde

BRU – Bruto

BU – Butanol

CCF – Cromatografia em Camada Fina

CG-EM – Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CMB – Concentração Mínima Bactericida

CMI – Concentração Mínima Inibitória

DCL – Diclorometano

CE₅₀ - Concentração Efetiva para obter 50% da atividade

DL₁₀₀ - Diclorometano 100%

DLAC₅₀ – Diclorometano/ Acetato de Etila 50%

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

HX - Hexano

HX₁₀₀ - Hexano 100%

HXDL₅₀ – Hexano/Diclorometano 50%

IH - Infecção Hospitalar

IBRAG – Comitê de Ética do Centro Biomédico

IMPPG - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes

IRAB - *Acinetobacter baumannii* resistente à Imipenen

ISAB - *Acinetobacter baumannii* sensível à Imipemen

MA – *Monstera adansonii*

ME₁₀₀ – Metanol 100%

MD – *Monstera deliciosa*

MH - Mueller-Hinton

MS - Ministério da Saúde

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORSA- *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina

OSSA- *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina

OXA- Oxacilina

PBS – Solução Tampão

SPE – Extração em Fase Sólida

SUS - Sistema Único de Saúde

TR – Tempo de Retenção

TSB - Tryptic Soy Broth

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

UV- Ultra-Violeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Plantas Medicinais e Atividade Antibacteriana: Aspectos Gerais.	21
1.2. A Família Araceae	24
1.2.1. Química da Família Araceae	25
1.2.2. O Gênero <i>Monstera</i>	26
1.2.3. As Espécies <i>Monstera adansonii</i> e <i>Monstera deliciosa</i>	27
1.3. Produtos Naturais x Resistência Bacteriana	29
1.3.1. Mecanismo de Ação de Agentes Antibacteriano	34
1.3.2. Infecções Hospitalares Bacterianas: Características Gerais.	35
1.3.3. Micro-organismos Multirresistentes	36
1.3.4. As Espécies <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i>	37
1.4. Ácidos Graxos	39
1.5. Flavonóides: Aspectos Antioxidantes	40
2. OBJETIVOS GERAIS	45
2.1. Objetivos Específicos	45
3. MATERIAIS e MÉTODOS	46
3.1. Coleta do Material Vegetal e Obtenção do Extrato	46
3.1.1. Material Vegetal	46
3.1.2. Obtenção do extrato bruto e partições	46
3.2. Processo de Purificação dos Extratos	48
3.2.1. Filtração à Vácuo: Extratos hexânicos de <i>Monstera adansonii</i> e <i>Monstera deliciosa</i> e extrato em diclorometano de <i>M. adansonii</i> .	49
3.3. Análise Cromatográfica	51
3.3.1. Preparação do Material para Análise por Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).	51
3.3.2. Curva de Calibração para Quantificação dos Ácidos Graxos por CG-EM.	52

3.3.3. Preparação do Material para Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	53
3.4. Avaliação da Atividade Antibacteriana dos Extratos e Constituintes Químicos das Espécies Vegetais	55
3.4.1. Método de Diluição em ágar Müeller-Hinton (NCCLS, 2010).	57
3.5. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB) pelo Método de Diluição em Caldo.	59
3.5.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	59
3.5.2. Determinação da CMB.	59
3.6. Curva de Crescimento da Amostra ATCC 29213 de <i>S. aureus</i> na Presença de Sub-fração Ativa do Extrato Hexânico de <i>M. adansonii</i>	62
3.7. Curva de Morte da Amostra ATCC 29213 de <i>S.aureus</i> na Presença da Sub-Fração Ativa do Extrato Hexânico de <i>M. adansonii</i>	63
3.8. Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método do DPPH	64
3.9. Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método ORAC	66
3.10. Avaliação da Capacidade Quelante do Íon Ferroso	67
3.11. Avaliação da Toxicidade In-vitro do EH e da Sub-fração Ativa HXDL50 de MA	68
3.12. Avaliação da Toxicidade Aguda do Extrato Hexânico	69
3.13. Análise Estatística	70
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1. Processo de Partição Líquido-Líquido	71
4.2. Pré-purificação das Sub-frações do Extrato Hexânico de <i>M.deliciosa</i> e dos Extratos Hexânico e Diclorometânico de <i>M. adansonii</i>	71
4.2.1. Sub-frações dos Extratos Hexânicos	71
4.2.2. Sub-frações do Extrato em Diclorometano de <i>Monstera</i>	73

<i>adansonii</i> .	
4.4. Análise Química das Sub-frações dos Extratos hexânicos de <i>Monstera adansonii</i> por Cromatografia em Fase Gasosa	74
4.4.1. Fração HXDL ₅₀	74
4.4.2. Fração DL ₁₀₀	77
4.4.3. Fração DLAC ₅₀	79
4.4.4. Análise Química da Fração Ativa HXDL ₅₀ (<i>Monstera adansonii</i>) x HXDL ₅₀ , Inativa (<i>Monstera deliciosa</i>).	80
4.4.5. Curva de Calibração para Quantificação dos Ácidos Graxos.	81
4.4.6. Análise Química das Sub-frações do Extrato Diclorometano de <i>Monstera adansonii</i>	82
4.5. Análise Química das Sub-frações dos Extratos hexânicos de <i>Monstera adansonii</i> por Cromatografia por CLAE	85
4.6. Atividade Antibacteriana da <i>Monstera adansonii</i> e <i>M. deliciosa</i>.	89
4.7. Avaliação da Atividade Antibacteriana das Sub-frações dos Extratos hexânico e Diclorometânico de <i>Monstera adansonii</i>.	91
4.7.1. Determinação da CMB Frente a <i>S. aureus</i> (ATCC 29213).	93
4.8. Avaliação da Curva de Crescimento e de Morte de <i>S.aureus</i> ATCC 29213 na Presença da Sub-fração Obtida pelo Extrato hexânico de <i>M. adansonii</i>.	95
4.9. Avaliação da Capacidade Antioxidante pelo Método DPPH	97
4.10. Avaliação da Capacidade Antioxidante pelo Método ORAC	100
4.11. Avaliação da Capacidade Quelante do Íon Ferroso	103
4.12. Avaliação da Citotoxicidade In-vitro do Extrato Hexânico e da Sub-Fração Hexano/dicloro 50%	106
4.13. Avaliação da Toxicidade Aguda do Extrato Hexânico de <i>M. Adansonii</i>	108
5. CONCLUSÕES	110

6. PESPECTIVAS FUTURAS	112
7. REFERÊNCIAS	113

1.INTRODUÇÃO

1.1. Plantas Medicinais e Atividade Antibacteriana: Aspectos Gerais.

O homem durante o processo evolutivo, utilizou de várias maneiras os recursos oferecidos pela natureza, com objetivo de buscar melhores condições para sua sobrevivência e melhor adaptação ao meio em que vive. No processo histórico das plantas medicinais, muitas civilizações descreveram o uso de vegetais como medicamentos em seus registros e manuscritos. Dados literários mostram que espécies vegetais utilizadas na prevenção ou cura de doenças são encontrados desde 50.000 anos atrás. O homem primitivo intuitivamente procurava suprir suas necessidades básicas como reprodução, nutrição e proteção descobrindo nas plantas a forma de prevenir ou tratar doenças (DEVIENNE et al., 2004).

A ação farmacológica dos produtos naturais, deve-se a princípios ativos denominados metabólitos secundários (TAUFNER et al., 2006), os quais, até a década de 1980, tinham os aspectos funcionais referentes a seu metabolismo totalmente ignorados, sendo em 1950 considerados como resíduos metabólicos. Só a partir de 1970 com o conhecimento bioquímico aprofundado do metabolismo secundário, estes deixaram de ser produtos finais inertes para serem considerados componentes do metabolismo vegetal (HARTMANN, 2007). Os metabólitos secundários são produzidos como um mecanismo de defesa das plantas contra micro-organismos, insetos e herbívoros. Como exemplo, temos os terpenóides, que são responsáveis pelo cheiro, auxiliando na atração de agentes polinizadores. Já os taninos e quinonas tem se mostrado responsáveis pela pigmentação e, com isso,

contribuem para a atração dos referidos agentes e maior dispersão de sementes (COWAN, 1999), favorecendo a propagação da espécie.

A medicina tradicional tem se tornado cada vez mais popular atualmente, uma vez que as plantas medicinais continuam exercendo um grande papel na prevenção e combate a doenças graves em todo o mundo (TSHIBANGU et al., 2002 & LEWIS et al., 2000). No período de 1981 a 2006, 52% das pequenas moléculas descobertas e em processo de desenvolvimento são produtos naturais ou tiveram suas origens em produtos naturais (NEWMAN et al., 2007).

Devido à dificuldade de acesso ao meio hospitalar, às limitações no tratamento convencional e à distribuição escassa das drogas, uma grande parte dos doentes se trata com extratos de plantas. Informações referentes à etnomedicina mostraram-se bastante importantes para o processo de descoberta de novos fármacos. Em um total de 122 compostos naturais mundialmente comercializados, 80 % possuem uso etnomedicinal idêntico ou semelhante ao uso corrente desses fármacos (FABRICANT & FARNSWORTH, 2001).

Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais (COUTINHO et al., 2009) e se forem considerados as 250.000 espécies de plantas estimadas (angiospermas e gimnospermas) somente 6% tiveram atividade biológica estudada (VERPOORTE, 2000). O Sistema Único de Saúde (SUS), valorizando a importância dos fitoterápicos, ampliou no ano de 2009 a distribuição de fitoterápicos, e com isso o número de fitoterápicos financiados pelo SUS passou de dois para oito. Segundo o Ministério da Saúde (MS) *“a fitoterapia consiste em uma modalidade das práticas integrativas e complementares mais*

freqüentemente encontrada no SUS”, sendo identificada em 9% dos municípios pelo MS no ano de 2008.

A aceitação da medicina tradicional tem aumentado entre todos os grupos sócio-econômicos, tornando a fitoterapia um setor econômico importante (LIMA et al., 2006). Cerca de 80% da população mundial utiliza medicamentos à base de plantas (KUETEA et al., 2008), inclusive no combate a doenças infecciosas. Neste contexto, têm-se registros de que o uso de plantas no combate a doenças microbianas é praticado desde a antiguidade e vem crescendo cada vez mais até os dias de hoje (RÍOS & RECIO, 2005).

Nas últimas décadas, a pesquisa por novos agentes antiinfecciosos tem sido foco de muitos grupos de pesquisa no campo da etnofarmacologia (RÍOS & RECIO, 2005). Uma revisão realizada por Ríos & Recio (2005), na PubMed, sobre atividade antimicrobiana de plantas medicinais, durante o período de 1966 e 1994, apontou 115 artigos sobre o tema. Contudo, na década seguinte, entre 1995 e 2004, este número quase triplicou, com um total de 307 artigos publicados. Esses dados mostram claramente o aumento do interesse da comunidade científica por pesquisas na área de produtos naturais com potencial para esta atividade biológica (NGWENDSON et al., 2003). As indústrias se concentram em programas de triagem a fim de identificar novos antibióticos a partir de fontes naturais (KUMAR et al., 2010). Devido ao aumento alarmante na incidência de novas doenças infecciosas e resistência aos fármacos atuais, existe uma grande necessidade em descobrir novos compostos químicos com atividade antimicrobiana e, possivelmente, com novos mecanismos de ação (ADWAN et al., 2010).

1.2. A Família Araceae

A família Araceae pertence à classe das monocotiledôneas, compreendendo aproximadamente 105 gêneros e 3500 espécies (MAYO et al., 1997). Sua distribuição ocorre em todos os continentes, exceto na Antártida (HEYWOOD, 1993) mostrando-se predominantemente tropical. No Brasil, a família é representada por 30 gêneros e 402 espécies (MAYO e BARROSO, 1997). A maioria das aráceas desenvolve-se preferencialmente em lugares úmidos e sombreados. Diversos membros da família Araceae são valorizados por suas folhagens ornamentais ou por suas inflorescências exóticas, e por este motivo, muitas vezes são causadoras de intoxicações em crianças, principalmente pela grande concentração de cristais de oxalato de cálcio na forma de ráfides. Além disso, há espécies reconhecidas por serem comestíveis como a “taioba” *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott e a espécie *Monstera deliciosa* Liebm.. Também são conhecidas por seus valores medicinais, pois em culturas antigas, algumas Araceae são utilizadas na cura de picadas, feridas e doença de pele. Corroborando esta utilização popular, estudos científicos mostram que a espécie *Xanthosoma sagittifolium* (L.) apresentou atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* (CHEN e BENNY, 2007), considerados importantes agentes infecciosos. Outras espécies também são conhecidas por suas atividades terapêuticas, como exemplo disso temos a *Pinellia ternata* vulgarmente conhecida como “Ban Xia” utilizada no tratamento do câncer de mama, estômago e leucemia (CHEN & BENNY, 2007).

Rhaphidophora pertusa Schott. é conhecida por apresentar importante atividade antioxidante pelo método DPPH e capacidade quelante do íon ferroso. Além disso, *Rhaphidophora pertusa* apresentou atividade antibacteriana contra

Staphylococcus aureus, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* com CMI de 2 mg/mL (SASIKUMAR & DOSS, 2006).

1.2.1. Química da Família Araceae

Há recentes relatos na literatura a cerca da ocorrência e do isolamento de compostos lipídicos em algumas espécies da família Araceae. Saglik e colaboradores (2002a e 2002b) identificaram a presença dos ácidos: oléico, linoléico, palmítico, palmitoléico e esteárico no óleo das sementes de *Arum italicum* Miller e *Dracunculus vulgaris* Schott como mostra figura 1.

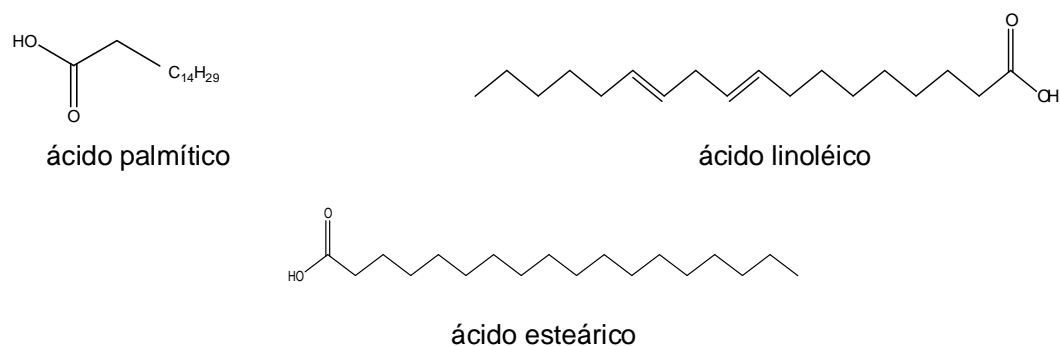


Figura 1. Estrutura química dos ácidos palmítico, linoléico e esteárico presentes no óleo das sementes de *Arum italicum* Miller e *Dracunculus vulgaris* Schott (Saglik et al., 2002a e 2002b).

Em estudos posteriores e complementares, Meija e Soukup (2004) demonstraram que, além dos perfis de ácidos graxos relatados anteriormente para espécies da família Araceae, algumas sementes apresentaram características lipídicas mais complexas, com ácidos fenilalcanóis e fenilalcenóis de cadeia longa e curta. Esta composição química não foi apenas relatada em sementes desta família. Pupo e colaboradores (1996) relataram a ocorrência de um triterpeno do tipo cicloartano e ácidos dos tipo n-fenipropanóico e n-fenildecenóico (Figura 2) em

folhas de *Trichilia clausenii*. Chernenko e colaboradores (2005) quantificaram também a composição lipídica das folhas de *Eminium lehmanii*, sendo descritos majoritariamente monogalactosildiglicerídeos e digalactosildiglicerídeos.

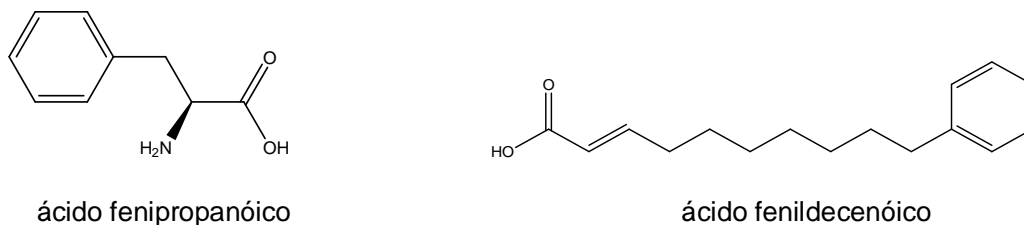


Figura 2. Estrutura química dos ácidos dos tipo n-fenilpropanóico e n-fenildecenóico em folhas de *Trichilia clausenii*. (Chernenko et al., 2005)

1.2.2. O Gênero *Monstera*

O gênero *Monstera* compreende 27 espécies, podendo-se destacar *Monstera adansonii* Schott (ANDRADE et al., 2007), *M. deliciosa* Liebm., *M. dilacerata*, *M. dubia*, *M. expilata*, *M. obliqua*, *M. pertusa*, dentre outras, as quais encontram-se amplamente dispersas na América do Sul. As plantas do gênero *Monstera* são tipicamente trepadeiras e fixam-se pelos troncos e ao longo dos ramos das árvores, agarrando-se às cascas por meio de raízes aéreas grossas, que não só prendem a planta à árvore, como também absorvem água e nutrientes, estando distribuídas na América tropical (TAM et al., 2004). Espécies deste gênero possuem um fruto popularmente conhecido como Cerimúm, o qual possui um aroma agradável semelhante a uma combinação de banana com abacaxi, porém se for ingerido antes do amadurecimento, pode causar queimaduras na língua devido a presença de ráfides na polpa, as quais desaparecem nos frutos maduros que são utilizados em indústrias de bebidas (PLOWMAN, 1969). O gênero *Monstera* é pobremente estudado acerca de seus constituintes químicos. A principal contribuição científica

até hoje para o gênero foi a identificação do alcalóide volátil aroidina em *Monstera pertusa* e *Monstera obliqua*, havendo, assim, a importância de novos estudos de caracterização química para o referido gênero. Especificamente para as espécies *M. deliciosa* Liebm e *M. adansonii* Schott, não existem estudos baseados no isolamento e na caracterização dos constituintes químicos dessas espécies, despertando o interesse do nosso grupo pelo presente estudo.

1.2.3. As Espécies *Monstera adansonii* e *Monstera deliciosa*

Monstera adansonii Schott e *Monstera deliciosa* Liebm. (Figura 3a e 3b) ocorrem amplamente na América do Sul já tendo sido registradas em quase todo o Brasil, principalmente em toda região da Mata atlântica, no Nordeste, Sul e Sudeste, geralmente em regiões montanhosas e florestas inclinadas. Seu ciclo de vida ocorre em florestas úmidas e tropicais e atinge seu tamanho máximo na forma de grandes árvores (ANDRADE et al., 2007).

São espécies comuns no Brasil e não são particularmente abundantes em qualquer localidade. Florescem de outubro a dezembro e frutificam de janeiro a agosto (GONÇALVES e TEMPONI, 2004). Predominam ao longo do ano, onde não há exposição de ventos secos e do sol. É caracterizada por sua morfologia floral e vegetativa e pela preferência por lugares sombreados. A biologia reprodutiva destas espécies ainda não foi estudada em detalhes. A inflorescência é uma espiga densa (espádice) de pequeno porte, com flores bissexuais sem perianto (ANDRADE et al., 2007). A morfologia da planta encontra-se na figura 4.



3a. *Monstera adansonii* Schott,



3b. *Monstera deliciosa* Liebm.

Figura 3. Partes aéreas das espécies *M.adansonii* Schott. e *M. deliciosa* Liebm. Disponível em <http://plantsarethe strangestpeople.blogspot.com/2009/10/fun-with-plant-names.html>).

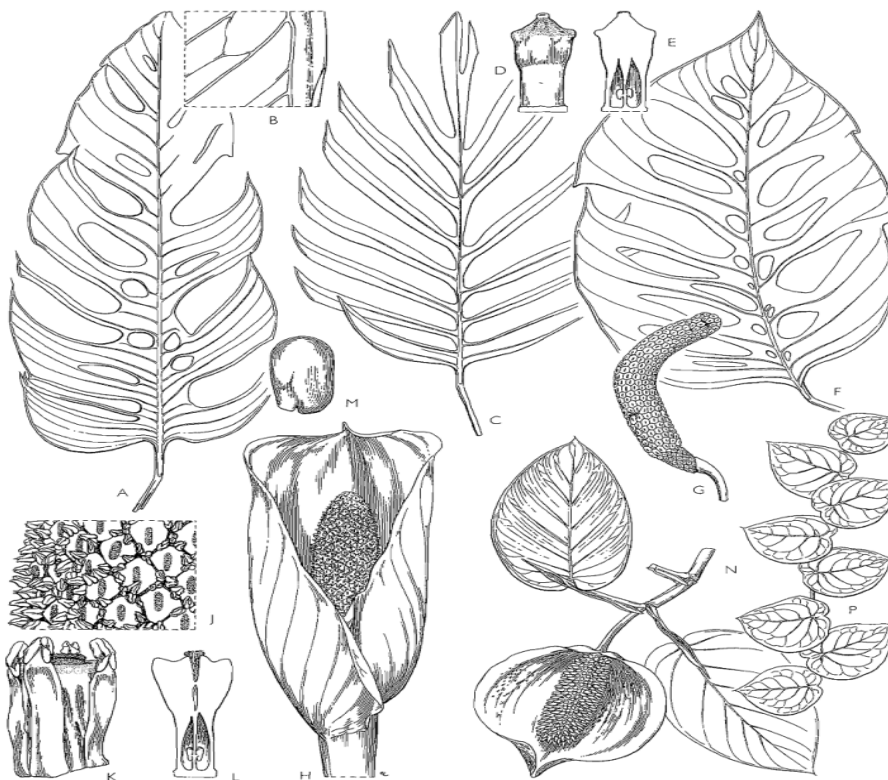


Figura 4. Partes da planta do gênero *Monstera*: A, C, F : folhas/ B: nervura das folhas/ D , E: gineceu/ G: fruto/ H: inflorescência/ K: flor/ L: gineceu/ M: semente/ N: floração/ P: Tamanho juvenil (GONÇALVES e TEMPONI, 2004).

1.3.Resistência Bacteriana x Produtos Naturais

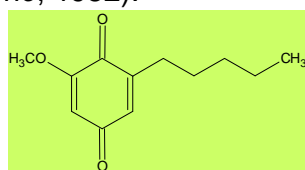
Mesmo com grandes avanços no controle do crescimento de diversos patógenos, grande parte das doenças que afetam milhares de pessoas ainda tem sido causada por micro-organismos (KAMATOU et al., 2007). Bactérias multirresistentes são um emergente e conhecido problema mundial de saúde (VONBERG et al., 2008), incluindo o Brasil, principalmente em unidades de tratamento intensivo (UTIs) (PUEYOA et al., 2011). O grande aumento em infecções hospitalares, causada por bactérias resistentes ou multirresistentes é um dos maiores problemas de saúde pública (FONTANAY et al., 2008). Especialmente na última década, o grau de resistência aos antibióticos comuns é cada vez mais crescente em todo o mundo (TANG et al., 2011).

Uma das principais causas de resistência antimicrobiana é a grande exposição aos fármacos antimicrobianos, dentre outros, através da prática da automedicação. (FURTADO et al., 2008). Outro fator importante que pode levar a resistência antimicrobiana é a baixa renda, isto é, má alimentação, educação deficiente, péssimas condições de higiene, o que favorece a disseminação de bactérias mais resistentes (BYARUGABA, 2005). A resistência antimicrobiana também está relacionada a recombinação e transmissão de genes de resistência, (FANGRAT et al., 2005), sendo o comprometimento do sistema imunológico também um outro agravante no combate à resistência aos micro-organismos, visto que, a ausência de um sistema de defesa capaz de superar o processo de infecção bacteriana tende a selecionar cepas com maior capacidade de sobrevivência (HARBARTH e SAMORE, 2005). A resistência aos antimicrobianos é uma grande ameaça a saúde pública, pois torna o tratamento ineficaz aumentando a mortalidade, morbidade e os custos,

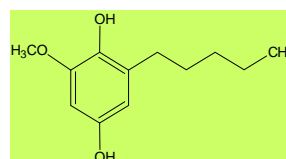
especialmente em países em desenvolvimento como o Brasil (QUAVE et al., 2008). Dados da OMS mostram que desde 1970 foram identificadas cerca de 40 doenças infecciosas inéditas, o que significa cerca de uma por ano (OMS, 2007).

Apesar das indústrias farmacêuticas terem produzido novos agentes antibacterianos nos últimos anos, o interesse estende-se à análise de substâncias naturais frente a cepas que se apresentam multirresistentes aos antimicrobianos comuns (SUFFREDINI et al., 2006).

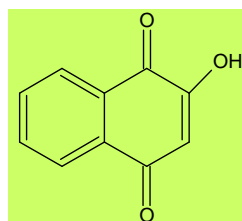
O uso de plantas medicinais é o método mais antigo para cura de doenças infecciosas (KOOCHAK et al., 2010). As primeiras substâncias antimicrobianas isoladas de espécies vegetais são a primina e a miconidina, pertencentes ao gênero *Miconia* (Melastomataceae); lapachol, lapachona e outras naftoquinonas (*Tabebuia avellanedae*) e plumbagina (*Pera ferrugineae* Muell. Arg) (Figura: 5), tendo já sido apresentada atividade frente a *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. e *Escherichia* sp. (Gonçalves et al., 1970a,b; Paternó, 1982).



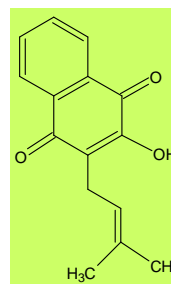
Primina



Miconidina



Lapachol

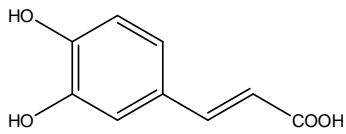


Plumbagina

Figura 5. Primeiras substâncias com atividade antibacteriana isoladas de espécies vegetais (Gonçalves et al., 1970a,b; Paternó, 1982).

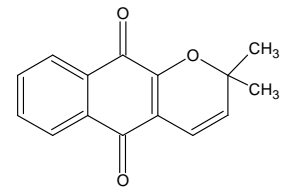
Dentre as principais classes de substâncias antimicrobianas já descritas derivadas de espécies vegetais estão os fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonóides, flavonas, flavonóis, taninos, cumarinas, terpenóides, óleos essenciais, alcalóides e lectinas (COWAN, 1999) (Figura 6).

Fenóis simples e ácidos fenólicos



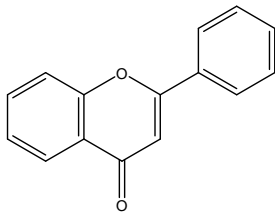
Ácido cafeico

Quinonas



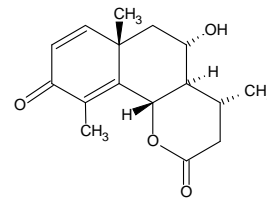
α -Xiloidona

Flavonas e Flavonoides



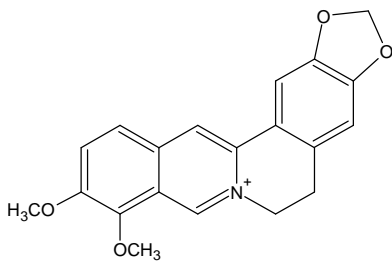
Flavona

Terpenóides



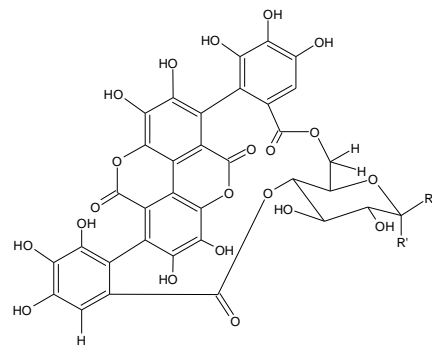
Artemisina

Alcalóides



Berberina

Taninos



Punicalina R=OH, R=H

R=H, R=OH

Figura 6. Substâncias naturais antimicrobianas isoladas de diferentes espécies vegetais.

Diversos estudos já foram publicados por nosso grupo de pesquisa focando na busca de extratos vegetais com atividade frente a estes patógenos. Em 2005, Machado e colaboradores promoveram o fracionamento dos extratos hexânicos das espécies *Aristolochia cymbifera* (Kókolos®) e *Myroxylon balsamum* (Astmoflora®) que levaram a identificação do diterpeno ácido 2-oxo-populifólico e da chalcona isoliquiritigenina, respectivamente, como agentes antibacterianos.

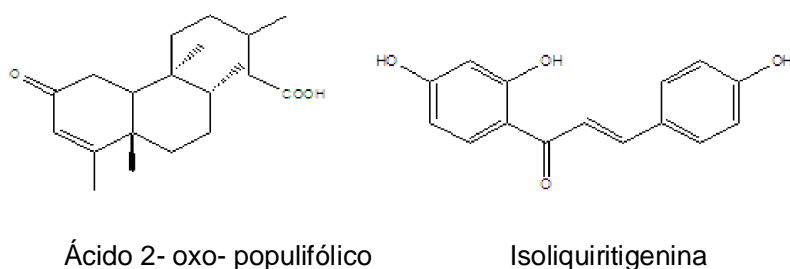


Figura 7. Estrutura química do ácido 2-oxo-populifólico e da isoliquiritigenina (Machado et al., 2005).

Também abordamos a importância do uso da técnica de CLAE-DAD como importante ferramenta para identificação e isolamento de constituintes químicos ativos. Em um estudo publicado em 2005 promovemos o fracionamento do extrato em acetato de etila de frutos de *Punica granatum*, guiado por ensaios antimicrobianos frente a colônias de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina. A purificação através de CLAE preparativa conduziu ao isolamento e à posterior determinação estrutural de taninos elágicos. A identificação das substâncias foi realizada por RMN de ^1H e com o auxílio da técnica de CLAE-UV, que permitiu verificar a presença de taninos hidrolizáveis punicalina α , punicalina β , punicalagina α e punicalagina β .

Um outro estudo baseado no uso do CLAE-DAD para o monitoramento do perfil de sub-frações com atividade antibacteriana obtidas da espécie *Zizyphus joazeiro* foi recentemente publicado (LEAL et al., 2010). Neste trabalho

correlacionou-se a atividade antibacteriana frente a bactérias hospitalares a presença de triterpenos do tipo ceanotano e lupano, os quais foram posteriormente purificados por CLAE preparativa. Este foi o primeiro estudo relatando a presença de triterpenos com esqueleto ceanotano na referida espécie vegetal bem como pela primeira vez descrita a atividade antibacteriana *in vitro* destes frente a bactérias isoladas de fontes clínicas. O ácido ceanótico 28-O-metil foi identificado como um potente agente antibacteriano frente a diferentes cepas de *Staphylococcus* spp., incluindo amostras resistentes, enquanto o ácido 3-desoxi-27- carboxiceanothanolico foi identificado como um constituinte químico inédito apesar de não ter sido correlacionado com a atividade observada. Ainda neste estudo, os ácidos 28-O-metil betulínico e betulínico, assim como o ácido alfitólico, foram isolados e identificados, sendo aos últimos conferida atividade antibacteriana frente a amostras ATCC de *S. aureus*.

1.3.1. Mecanismo de Ação de Agentes Antibacterianos

Os antimicrobianos podem ser naturais ou sintéticos e podem agir tanto inibindo o crescimento, sendo chamado de bacteriostático ou, causando a morte da bactéria, sendo classificado como bactericida (GUIMARÃES et al., 2010). Os agentes antimicrobianos podem atuar de diversas maneiras, dentre elas estão, interferência na síntese da parede celular (B- lactâmicos), ligação a subunidade ribossomal 50S (macrolídeos) e 30S (aminoglicosídeos), inibindo a síntese de DNA (fluoroquinolonas) e RNA (Rifampicina), inibição da via metabólica (sulfonamidas), interferência na síntese de ácidos nucleicos e rompimento da estrutura da membrana bacteriana (polimixinas) (TENOVER, 2006). Existem poucos estudos

sobre o mecanismo de ação de produtos naturais e extratos vegetais, entretanto, alguns estudos já foram descritos, dentre eles, a ação de flavonóides sobre a inibição na síntese de DNA de *Proteus vulgaris* e RNA de *S. aureus*, causando um empilhamento de bases de ácidos nucléicos (CUSHNIE et al., 2005).

Os polifenóis são conhecidos por formar complexos solúveis de alto peso molecular com as proteínas e também podem se ligar a adesinas bacterianas e interferir na disponibilidade dos receptores na superfície das células. O átomo ligante e o número de grupos hidroxila estão associados ao efeito tóxico nos microorganismos, sendo que o aumento na hidroxilação resulta no aumento da toxidez e, conseqüentemente, maior é a inibição do crescimento microbiano (SCALBERT, 1991). Os taninos podem inibir enzimas microbianas extracelulares, privando o substrato necessário para o crescimento antimicrobiano, ou agir diretamente sobre o metabolismo microbiano através da inibição da fosforilação oxidativa (SCALBERT, 1991).

Os terpenos, por exemplo, em especial os sesquiterpenos, parecem agir através da ruptura de membranas celulares, levando a morte do microorganismo. Trombetta e colaboradores (2005) verificaram que mentol, timol e acetato de linalila podem provocar alterações na porção lipídica da membrana plasmática de microorganismos, que resultam em perturbações na permeabilidade da membrana e perda de material intracelular.

1.3.2. Infecções Hospitalares Bacterianas: Características Gerais.

No meado de 1950 nos Estados Unidos, uma cepa virulenta de *Staphylococcus aureus* causou várias mortes, que estavam associadas a intervenções cirúrgicas. A

partir desta época, formaram uma comissão de vigilância de infecção hospitalar, a fim de isolar e identificar os microrganismos responsáveis pelas infecções hospitalares (EMMERSON, 1995).

As infecções são consideradas infecções hospitalares (IH) quando diagnosticadas pelo menos 48 horas após admissão hospitalar ou de Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (VOGELAERS et al., 2010). A infecção hospitalar é a segunda maior causa de morte no mundo, seguida das doenças cardiovasculares (OLAECHEA et al., 2010), além de ser um grande problema sócio-econômico devido ao aumento de permanência nas UTIs, conseqüentemente, aumentando os custos (MOOR & FERGUNSON, 2006). No Brasil, a IH, é a quarta causa de mortalidade. Aproximadamente, entre 25 e 35 % dos pacientes em UTIs adquirem infecção hospitalar (LEISER et al., 2007), sendo um dos principais problemas de saúde pública devido a alta taxa de morbidade e mortalidade (PAYÁ et al., 2009).

A colonização bacteriana está fortemente associada com internação e é freqüente em pacientes graves devido a baixa imunidade, administração de drogas imunossupressoras, normalmente usadas em UTIs, uso de procedimentos invasivos como ponta de cateter, além da grande freqüência na administração e antibióticos (VINCENT, 2003).

1.3.3. Microorganismos Multirresistentes

A resistência dos microrganismos aos antimicrobianos tornou-se um grande problema de saúde, tanto em hospitais quanto na comunidade. Com o surgimento de novas doenças houve a evolução dos chamados microrganismos multirresistentes. Essa resistência resulta em um aumento da duração e gravidade

da doença, aumentando tempo de internação, gerando maiores custos ao Sistema único de saúde. A resistência também interfere em alguns procedimentos de tratamento o paciente como cirurgias, no tratamento de imunodeprimidos e idosos, isto é, a resistência microbiana provavelmente surge a partir de uma resposta a várias condições e oportunidades (COHEN et al., 1997).

O primeiro antibiótico foi descoberto em 1930, e até 1980 eles foram capazes de curar quase todos os tipos de infecções. A partir de 1980 houve um freqüente aumento da resistência aos antimicrobianos, tornando um motivo de grande preocupação entre médicos e na sociedade em geral. E ainda hoje os microrganismos continuam desenvolvendo resistência, como exemplo deste grande aumento vemos que no início de 1990 a resistência de *Staphylococcus aureus* à meticilina e cefalosporinas era cerca de 5%. Hoje nos Estados Unidos a resistência varia entre 50% à 60% estendendo-se à oxacilina, cloxacilina, amoxicilina-clavulanato, fluoroquinolonas e vancomicina (DRONDA & JUSTRIBÓ, 2007).

Staphylococcus aureus se tornam multirresistentes devido a alteração da enzima alvo dos antibióticos B-lactâmicos, que produz uma nova enzima com baixa afinidade pelo antibiótico, que é codificada pelo gene *mecA*. Este gene, está localizado em um elemento genético móvel chamado “Staphylococcal cassette chromosome *mec*” (SCC*mec*), que está presente no cromossomo de todos os isolados MRSA (FORBES et al., 2008).

1.3.4. As Espécies *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii*

Staphylococcus aureus foi descoberto na década de 1880 e em 1940 já era responsável por 80% das mortes por infecções. Ainda no ano de 1940 foi introduzida a penicilina, o primeiro fármaco utilizado em seu combate, mas dois anos depois os

Staphylococcus aureus já havia se tornado resistente. Após a utilização da penicilina muitos fármacos já foram criados, mas devido a rápida mutação dos *S.aureus* e grande resistência, inclusive aos novos fármacos, os mesmos vêm se tornando cada vez mais ineficazes na terapêutica de muitos pacientes (DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008). *S.aureus* é considerado um patógeno oportunista (FENG et al., 2008) e extremamente mutável que tem como principal sítio de colonização as narinas, porém, também pode colonizar as axilas, virilha e trato gastrointestinal. Essa colonização oferece um reservatório de bactérias que podem se tornar invasivos quando o hospedeiro apresenta baixa imunidade devida principalmente a aspiração, inserção de catéter ou cirurgia, e essa colonização tem como conseqüência o aumento do risco de infecção (GORDON & LOWY, 2008). *S. aureus* é o patógeno com maior incidência de isolamento em sítios de infecções hospitalares com taxa de 29,2%. Em seguida, estão *Klebsiella spp.* e *Acinetobacter spp.* com 13,2% e 12,5% respectivamente (Brasil, 2011). Rosenthal e colaboradores (2011) relatam que de 761 cepas de *S. aureus* isolados de UTIs de vários hospitais do mundo inteiro, 84,1% apresentaram resistência a oxacilina (OXA). As taxas dos patógenos mais isolados de sítios de infecções hospitalares no Brasil encontram-se representados na figura 8 (MARRA et al., 2011).

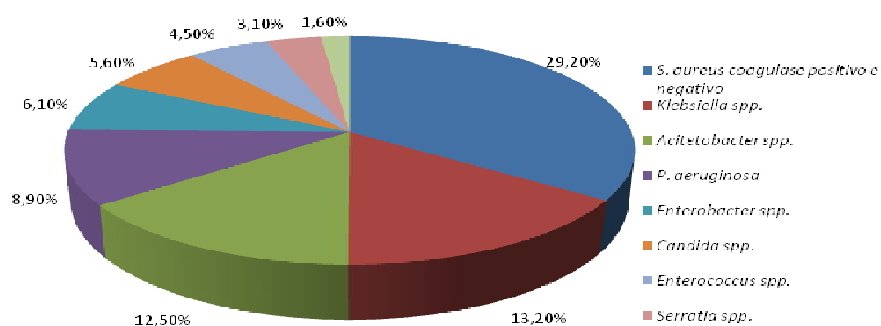


Figura 8. Patógenos mais isolados de sítios de infecções hospitalares no Brasil (MARRA et al., 2011).

Acinetobacter spp. são cocobacilos catalase positiva e oxidase negativa, gram-negativos, aeróbicos, não fermentativos, não móveis, não pigmentados. Em 1970 o *Acinetobacter baumannii* era considerado um patógeno oportunista de baixo risco e não despertava preocupação. O interesse tem crescido nos últimos anos devido sua expansão mundial e em UTIs levando a uma grande mudança nas infecções e o surgimento de cepas multirresistentes (GIAMARELLOU et al., 2008). Nos últimos 15 anos *Acinetobacter baumannii* tem se mostrado como um grave patógeno causando milhares de infecções hospitalares no mundo inteiro. Possui uma extrema capacidade de adquirir resistência a quase todas as classes de antibióticos se tornando um grande problema de saúde pública (MOTAOUAKKIL et al., 2006). Essa resistência múltipla acontece de forma extremamente rápida, causando diversos problemas terapêuticos. Os carbapenêmicos são geralmente escolhidos para combater infecções causadas por *Acinetobacter baumannii*, porém já existem relatos de resistência ao antimicrobiano Imipenem tornando um problema mundial e uma ameaça ao tratamento bem sucedido (BARAN et al., 2008).

1.4 Ácidos Graxos: Agentes Antibacterianos

A membrana estrutural de todas as células vegetais contém ácidos graxos, o que não ocorre com as células humanas, uma vez que estes organismos não são capazes de produzi-los, existindo a grande necessidade de ingeri-los na dieta (MILLAR et al., 2000).

A biossíntese de ácidos graxos, inicia com a enzima A carboxilase (ACCase), que converte acetil-coA em malonil-CoA. A ACCase é ativada pela luz promovendo a redução da carboxiltransferase, sendo esta considerada fundamental na síntese de

ácidos graxos uma vez que gera Malonil-CoA que atua como bloco de construção de ácidos graxos (CAHOON & SCHMID, 2008). O processo de biossíntese dos ácidos graxos está descrito de forma detalhada na figura 9 a seguir. As propriedades químicas desses ácidos são determinadas pela estrutura química, o comprimento da cadeia e o grau de insaturação (PINZI et al., 2011).

Nos últimos anos, os ácidos graxos começaram a desvendar algumas importantes relações estrutura-atividade no que diz respeito a seus potenciais biológicos (CARBALLEIRA, 2008). Podem proporcionar inúmeros benefícios a saúde, como por exemplo no combate a micro-organismos como *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* que podem causar várias patologias aos seres humanos (HUANG et al., 2010).

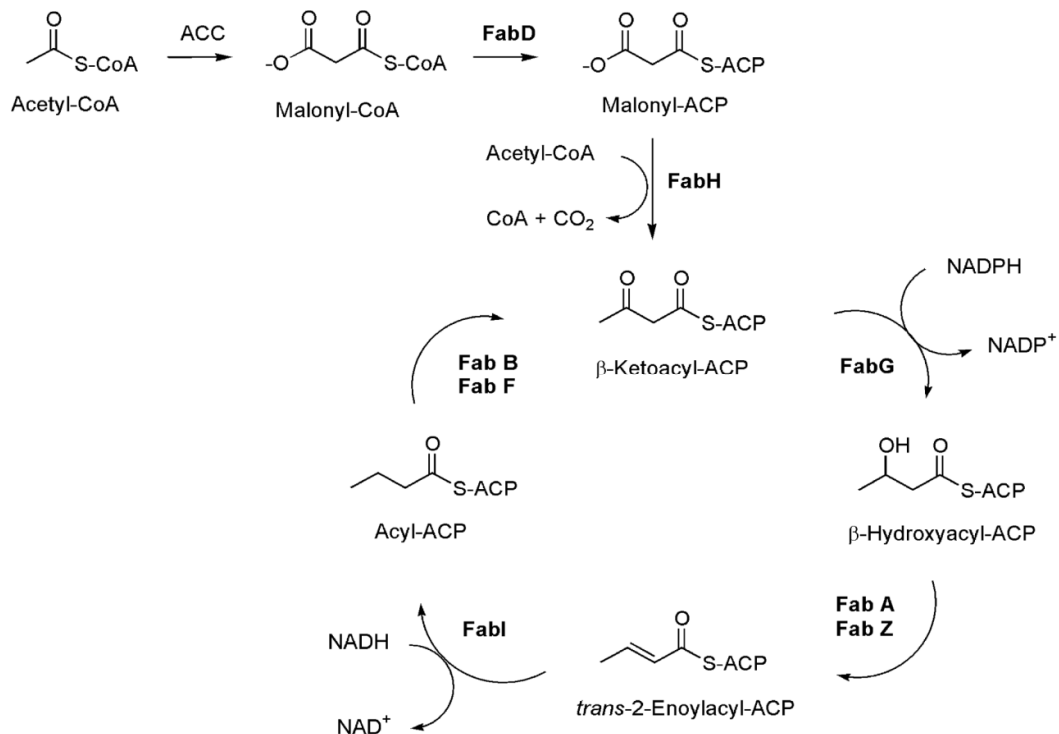


Figura 9. Biossíntese de ácidos graxos e as enzimas-chave no processo. ACC: acetil-CoA, carboxilase, ACP: proteína transportadora de acila, FabD: ACP transacilase, FabH: b-cetoacil-ACP sintase III, FabG: b-cetoacil-ACP redutase, FabA: b-hidroxidecanoil-ACP desidratase / isomerase, FabZ: b-hidroxiacil-ACP desidratase, FabI: enoil-ACP redutase, FabB: b-cetoacil-ACP sintase I, FabF: b-cetoacil-ACP sintase II (CARBALLEIRA, 2008).

1.5. Flavonóides: Aspectos Antioxidantes.

A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS) e reações que levam a produção de radicais livres podem levar ao estresse oxidativo celular, podendo causar doenças degenerativas ou patologias como câncer, doenças do coração, envelhecimento e Alzheimer (SUN et al., 2011).

Existem disponíveis atualmente muitos antioxidantes sintéticos tais como butil-hidroxianisol e butil-hidroxitolueno, entretanto, estes podem se acumular no corpo resultando em lesão hepática e carcinogênese. Por esta razão, como um esforço para proteção do ser humano aos radicais livres e retardamento do progresso de muitas doenças crônicas (SUN et al., 2011), tem sido dada grande atenção aos antioxidantes naturais.

Alguns estudos mostraram que a ingestão de frutas e verduras reduz a taxa de doenças cardíacas, câncer, e outras doenças degenerativas, e que este fato pode está atribuído a presença de antioxidantes naturais nestes alimentos. As plantas também são capazes de combater esses radicais livres (MOTAMED & NAGHIBI, 2010). O aumento do nível de EROS pode danificar a estrutura das biomoléculas e modificar suas funções; levar à disfunção celular e até mesmo a morte celular. A nossa rica flora e fauna levou a formação de seres vivos capazes de produzir várias moléculas com ação antioxidante, e essas substâncias naturais podem ser uma importante estratégia para o combate de várias enfermidades (MISHRA et al., 2012).

Os flavonoides são componentes químicos encontrados em muitas espécies vegetais, sendo identificado como os princípios ativos de muitos fitoterápicos disponíveis no mercado. Flavonoides possuem atividades farmacológicas e fisiológicas reconhecidas como ação sobre o fortalecimento da contratibilidade

cardíaca, inibição enzimática, ação antibacteriana, antiinflamatória, anti-câncer, anti-alérgica, anti-citotóxica, antioxidante natural além de ser usado como complemento alimentar. A quercetina, por exemplo, já é bastante reconhecida pelo seu potencial farmacológico, atuando no combate à febre, sinusite e asma. Por estas razões, existe um grande interesse científico no desenvolvimento de técnicas para otimizar a separação e purificação deste e outros flavonóides, sendo este grupo químico cada vez mais alvo de pesquisas científicas (LONG et al., 2011 e MARISWAMY et al., 2012). Os flavonoides são os pigmentos vegetais mais importantes para as flores exibirem as colorações amarela, vermelha ou azul nas pétalas, sendo estas importantes na atração de animais polinizadores. São um grupo grande estruturalmente, com um substituinte fenila na posição C2 ou C3. As principais subclasses de flavonoides são flavona, flavonol, isoflavona, flavanona, chalcona, antocianidina, catequina e flavanonol como mostra a figura 10. Muitas das vezes, são hidroxilados em posições, 3, 4, 5 ou 7, sendo frequentemente um ou mais desses grupos metilados, acetilados, prenilados ou sulfatados. Nas plantas, os flavonóides geralmente apresentam-se como O ou C-glicosídeos. Os O-glicosídeos, têm substituintes açúcar ligado a um grupo hidroxila da aglicona, geralmente localizado na posição 3 ou 7, enquanto que o C-glicosídeos têm grupos de açúcar ligado a um carbono da aglicona, geralmente na posição 6 (RIJKE et al., 2006).

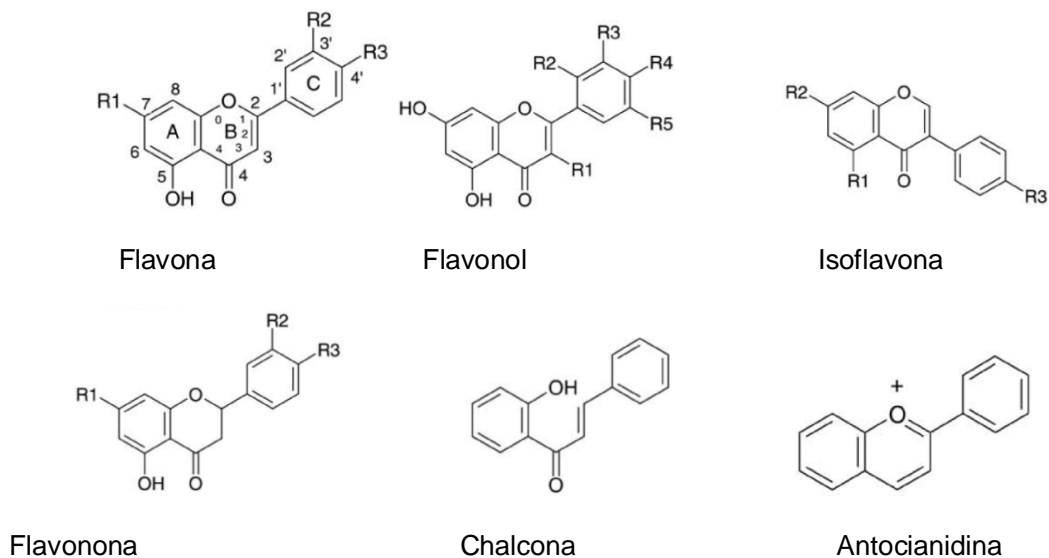


Figura 10. Principais grupos de flavonoides (RIJKE, et al., 2006).

Os radicais livres são substâncias agressivas sendo formados em locais fisicamente restritos, tais como peroxissomos, mitocôndria ou dentro da célula, como resultado do processo metabólico normal. A célula sobrevive à toxicidade de pequenas quantidades de radicais livres, no entanto, quando a produção de radicais livres torna-se excessiva, a ação dos antioxidantes e sequestradores de radicais torna-se importante para minimizar os danos às membranas, enzimas e genes. Os flavonóides são agentes bastante eficazes para esta finalidade uma vez que podem atuar regulando a produção de radical superóxido e peróxido de hidrogênio através da reação de Fenton. Uma outra forma de atuação é através da quelação de metais e suas propriedades de transição de quelação e interação direta com algumas enzimas e sangue. Os flavonoides se ligam aos metais de ferro e catalisam transporte de elétrons eliminando os radicais livres tornando –os potentes antioxidantes.(HAVSTEEN, 2002; ACKER et al., 1998). A quelação do metal pode ser responsável, não só pela atividade antioxidante de flavonoides, mas também por

outras atividades como inibição da lipooxigenases por quelação e redução de ferro no sítio ativo, isto mostra que a quelação de ferro representa grande importância na diversidade biológica da atividade de flavonóides (MLADENKA et al., 2011).

Existem vários relatos na literatura a respeito de flavonoides presentes em plantas com atividade antioxidante. Andarwulan et al (2010), relatam que as espécies *Cosmos caudatus* e *Polyscias pinnata* apresentaram atividade antioxidante pelo método DPPH e fenóis totais, o que pode está relacionado com a abundante presença de quercetina e kaempferol. Hossain e Rarman (2011), justificam que o grande potencial antioxidante do abacaxi testados pelos métodos DPPH, b-caroteno e fenóis totais deve-se a presença de flavonoides nos extratos acetato de etila, metanol e água. A casca de *Limoncella* sp. também apresentou alta capacidade antioxidante pelo método DPPH e farta presença de flavonoides (ABROSCA et al.; 2007).

Devido ao crescimento na prevalência de bactérias multirresistentes, em especial de amostras de *Staphylococcus* spp. resistentes a oxacilina, várias enfermidades de origem infecciosa permanecem com terapêutica inadequada. Portanto, a busca por agentes antibacterianos derivados de espécies vegetais pode representar uma importante alternativa. O conhecimento sobre o uso medicinal da família Araceae é extremamente limitado e os poucos estudos realizados mostraram que essa família possui um grande potencial quanto as propriedades farmacológicas, despertando o interesse por novos estudos. Mais especificamente, espécies do gênero *Monstera* são muito pouco estudadas quanto ao aspecto químico e farmacológico, portanto, novos estudos focando nesta investigação se fazem necessários, especialmente no que tange a busca por novas substâncias com potencial antibacteriano. Estudos preliminares realizados em nosso laboratório com

extratos da espécie *Monstera pertusa* revelaram importantes propriedades antibacterianas, estando a presente proposta pautada na ampliação deste estudo para demais espécies deste gênero.

2.OBJETIVOS GERAIS

Investigar a atividade antioxidante e antibacteriana de diferentes extratos e frações obtidos a partir das folhas de espécies vegetais do gênero *Monstera* frente a amostras bacterianas padrão e clínicas isoladas de sítios de infecção hospitalar como fluido corporal e dispositivos. E ainda, promover um estudo fitoquímico biomonitorado dos extratos selecionados para identificação dos constituintes químicos majoritários de interesse.

2.1. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais de diferentes polaridades obtidos das folhas das espécies *Monstera adansonii* e *Monstera deliciosa* pelo método DPPH, ORAC e Quelante de ferro.
- Avaliar a atividade antibacteriana de extratos vegetais e frações de diferentes polaridades obtidos das folhas das espécies *Monstera adansonii* e *Monstera deliciosa* frente a amostras padrão da coleção americana de culturas (ATCC) e amostras clínicas hospitalares, incluindo cepas de Estafilococos coagulase-positivo e coagulase-negativo e amostras bacterianas gram-negativas.
- Promover o rastreamento fitoquímico biologicamente guiado dos extratos mais ativos, através de métodos cromatográficos, com a finalidade de obter sub-frações ativas e, a partir destas, identificar os constituintes químicos majoritários bioativos;
- Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) de crescimento bacteriano dos extratos e sub-frações ativas utilizando o método de diluição em agar e/ou

método de diluição em caldo em microplacas;

- Determinar a concentração mínima bactericida (CMB) das sub-frações ativas das espécies vegetais.
- Avaliar a curva de crescimento e de morte do micro-organismo na presença da fração ativa, utilizando-se a cepa que se mostrou mais sensível nas etapas anteriores.
- Realizar o teste de citotoxicidade *in vivo* e *in vitro* da(s) sub-fração ativa(s).

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1. Coleta do Material Vegetal e Obtenção do Extrato

3.1.1 Material Vegetal

As partes aéreas (folhas) de *M. deliciosa* Liebm. foram coletadas no Jardim Didático do Departamento de Botânica da UFRJ em 2010, e as partes aéreas (folhas) de *M. adansonii* Schott. foram coletadas na vista chinesa no Rio de Janeiro em 2010. Os materiais vegetal foram identificados com o auxílio da professora Dr.^a Cassia Mônica Sakuragui e as exsicatas dos indivíduos foram depositadas no Herbário da UFRJ (*M. deliciosa* - RFA 36868 e *M. adansonii* - RFA 36869). Todo o material foi devidamente acondicionado em estufa à 40°C por 5 dias para o processo de secagem, sendo posteriormente pulverizado em pulverizador.

3.1.2. Obtenção do Extrato Bruto e Partições

O material seco e pulverizado (880 g de *Monstera deliciosa* e 505 g de *Monstera adansonii*) foi submetido a um processo de extração por maceração à frio em etanol (VETEC) absoluto por 5 dias. O macerado obtido foi concentrado em evaporador rotatório (Pemen®, com bomba de vácuo Cole Parmer Instrument Company modelo 7049-50 e um banho Fisatom® modelo 550 - 1200 W, 230 V) e 30 g foram posteriormente ressuspenso em 400 mL de uma solução de metanol:água(9:1), sob agitação e sonicação sendo submetido em seguida a um processo de extração líquido-líquido com hexano (VETEC). O extrato metanólico residual foi concentrado em evaporador rotatório e posteriormente ressuspenso em água, sendo esta solução particionada com os seguintes solventes: diclorometano, acetato de etila e butanol (VETEC) (LEAL, et al., 2011). Um esquema descritivo das

diferentes etapas do processo de fracionamento do extrato etanólico bruto com os respectivos solventes extratores estão ilustrados abaixo na Figura 11.

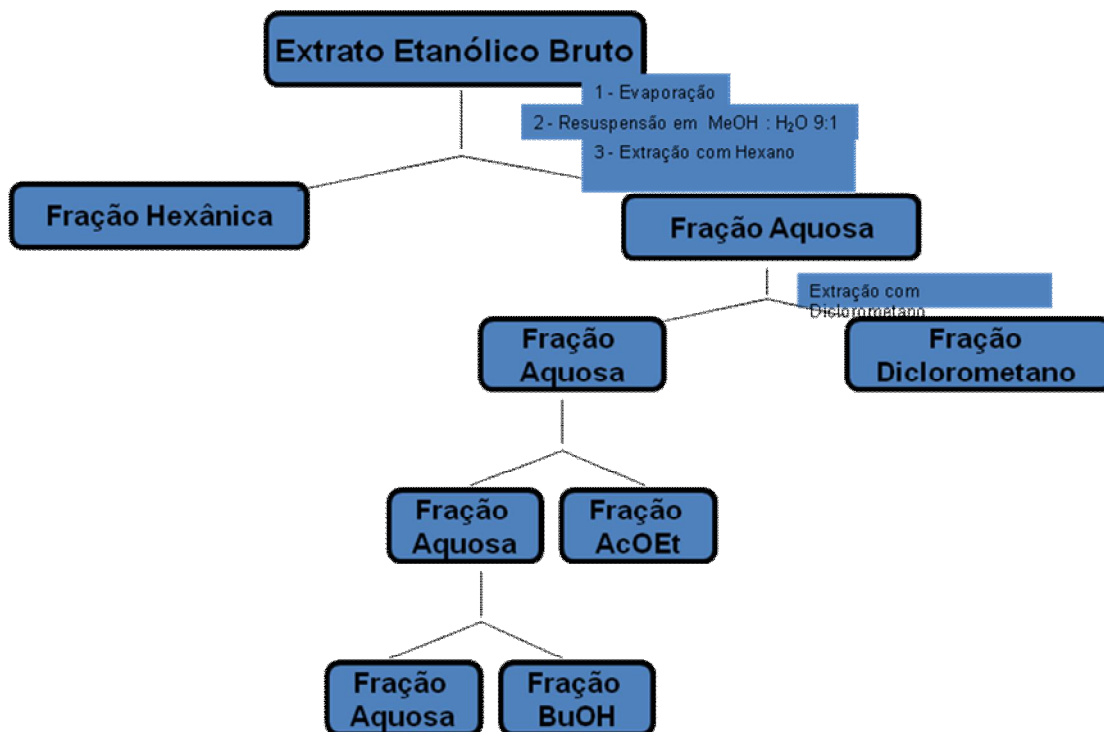


Figura 11. Metodologia referente à partição líquido-líquido com diferentes solventes (LEAL, et al., 2011).

3.2. Processo de Purificação dos Extratos

3.2.1. Filtração à Vácuo em Sílica Gel: Extratos Hexânicos de *Monstera adansonii* Schott e *Monstera deliciosa* Liebm e Extrato em Diclorometano de *M. adansonii* Schott.

Para filtração à vácuo, o extrato hexânico de cada planta (2g) e o extrato em diclorometano de *M. adansonii* (1,5g) foram pesados em um bécher e, em seguida, dissolvidos em diclorometano. À cada amostra foi adicionada sílica gel, sendo a mistura posteriormente submetida ao rota-evaporador (Pemen®). A pastilha formada foi acrescida ao funil de vidro sinterizado (8,5 cm de diâmetro e 6 cm de altura)

preenchido com sílica, sendo utilizados os seguintes sistemas de solventes descritos á seguir nas tabelas 1, 2a, 2b e 3 (Esse procedimento foi realizado para as duas espécies vegetais separadamente).

Tabela 1. Características da filtração à vácuo do extrato hexânico de *Monstera deliciosa* Liebm.

Proporção de solventes utilizados	Código	Volume de solvente (mL)
Hexano 100%	HX ₁₀₀	6 x 300
Hexano/diclorometano 50%	HXDL ₅₀	11 x 300
Diclorometano 100%	DL ₁₀₀	16 x 300
Diclorometano/acetato de etila 50%	DLAC ₅₀	8 x 300
Acetato de etila 100%	AC ₁₀₀	5 x 300
Acetato de etila/metanol 50%	ACME ₅₀	5 x 300
Metanol 100%	ME ₁₀₀	5 x 300

Tabela 2a. Características da filtração à vácuo do extrato hexânico de *Monstera adansonii* Schott (1^a)

Proporção de solventes utilizados	Código	Volume de solvente (mL)
Hexano 100%	HX ₁₀₀	3 X 300
Hexano/diclorometano 50%	HXDL ₅₀	8 x 300
Diclorometano 100%	DL ₁₀₀	4 x 300
Diclorometano/acetato de etila 50%	DLAC ₅₀	4 x 300
Acetato de etila 100%	AC ₁₀₀	5 x 300
Acetato de etila/metanol 50%	ACME ₅₀	6 x 300
Metanol 100%	ME ₁₀₀	5 x 300

Tabela 2b. Características da filtração à vácuo do extrato hexânico de *Monstera adansonii* Schott (2ª).

Proporção de solventes utilizados	Código	Volume de solvente (mL)
Hexano 100%	HX ₁₀₀	3 x 300
Hexano/diclorometano 50%	HXDL ₅₀	5 x 300
Diclorometano 100%	DL ₁₀₀	5 x 300
Diclorometano/acetato de etila 50%	DLAC ₅₀	4 x 300
Acetato de etila 100%	AC ₁₀₀	6 x 300
Acetato de etila/metanol 50%	ACME ₅₀	4 x 300
Metanol 100%	ME ₁₀₀	5 x 300

Tabela 3. Características da filtração à vácuo do extrato em diclorometano de *Monstera adansonii* Schott.

Proporção de solventes utilizada	Código	Volume de solvente (mL)
Hexano 100%	HX ₁₀₀	6 x 300
Hexano/diclorometano 50%	HXDL ₅₀	2 x 300
Diclorometano 100%	DL ₁₀₀	2 x 300
Diclorometano/acetato de etila 50%	DLAC ₅₀	3 x 300
Acetato de etila 100%	AC ₁₀₀	2 x 300
Acetato de etila/metanol 50%	ACME ₅₀	4 x 300
Metanol 100%	ME ₁₀₀	3x 300

3.2.2. Purificação do Extrato em Acetato de Etila por SPE (Extração em Fase Sólida)

100mg do extrato em acetato de etila de MD foi diluído em 500 µl de metanol (TEDIA) e submetido a um processo de fracionamento através de uma extração por SPE (Extração em Fase Sólida). Foi utilizado um cartucho do tipo SPE modelo

Phenomenex Strata C18-E (55um, 70A) 5g/20ml Giga tubes 8B-5001-LEG Solid phase extraction SPE products recheado com resina C18. O condicionamento do cartucho foi realizado utilizando 3 x 10 mL de acetonitrila (TEDIA) com fluxo de 10 mL/min, seguido de 3 x 10 mL de água deionizada a um fluxo de 10 mL/min. Para o início do processo extrativo, 500 µl da amostra foram aplicados na superfície da fase sólida do cartucho e eluiu-se a amostra com 10 mL de água deionizada 3x consecutivas, sendo as frações recolhidas em frascos individuais. O mesmo procedimento foi realizado com as seguintes soluções descritas na tabela 4. As sub-frações obtidas no processo de fracionamento foram evaporadas em rota-evaporador (Buchi Waterbater B-480 1200 W, 230 V) e liofilizadas (Beta 1-16-CHIST).

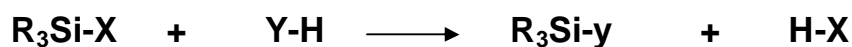
Tabela 4. Sub-frações obtidas do extrato em acetato de etila de MD através da extração por SPE.

Sistemas de solventes	Nº de extrações	Códigos das sub-frações
Água 100%	3 x 10ml	1, 2, 3
Acetonitrila 3%	3 x 10ml	4, 5, 6
Acetonitrila 10%	5 x 10ml	7, 8, 9, 10, 11
Acetonitrila 20%	4 x 10ml	12, 13, 14, 15
Acetonitrila 30%	5 x 10ml	16, 17, 18, 19, 20
Acetonitrila 50%	3 x 10ml	21, 22, 23
Acetonitrila 100%	4 x 10ml	24, 25, 26, 27
Metanol 100%	2 x 10ml	28, 29

3.3. Análise Cromatográfica

4.3.1. Preparação do Material para Análise por Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

- Uma alíquota de 2 mg/mL da sub-fração selecionada foi adicionada a um frasco de vidro âmbar com capacidade para 30 mL;
- Ao frasco adicionou-se 100 µL de N-metil-n-trimetilsilil trifluoroacetamida (MSTFA) (ALDRICH) e agitou-se vigorosamente em Vórtex. Aguardou-se por 15 minutos para a reação de derivatização;



Reagente sililante Composto com H ativo Composto sililado Hidrogênio com grupo de saída do reagente

Figura 12. Reação de derivatização (sililação).

- Em seguida, adicionou-se ao conteúdo do frasco 1mL de acetona, agitou-se vigorosamente e injetou-se no CG-EM.

A técnica de cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massa foi realizada em aparelho Shimadzu 2010 com interface GCMS-QP2010 e impacto eletrônico. A coluna utilizada para análise foi RTx-5Ms (L=30m; d=0.25µm); gás de arraste: hélio. As condições para a corrida cromatográfica estão descritas na tabela 5 abaixo. As substâncias foram identificadas através de comparação com os espectros de massas da biblioteca NIST05s.LIB.

Tabela 5. Rampa de temperatura por CG-EM para análise das frações apolares.

Velocidade (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
-	60°C	1.00
10°C/min	290°C	16.00
		45.00 (total)

T°C do injetor: 270°C (SPLIT) ; Condições do detector de massas: Fonte de ionização – 200°C; Interface-230°C

3.3.2 Curva de Calibração para Quantificação dos Ácidos Graxos por CG-EM.

A fim de se quantificar os ácidos graxos presentes nas sub-frações provenientes dos extratos hexânicos de MD e MA, construiu-se uma curva de calibração com amostras padrão dos ácidos palmítico e linoléico (SIGMA-ALDRICH) em diferentes concentrações, a saber: 0,10; 0,50; 1,0; 5,0; 10 mg/mL. Para a análise utilizou-se a técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) em aparelho Shimadzu 2010 com interface GCMS-QP2010 e impacto eletrônico (coluna RTx-5Ms ; L=30m; d=0.25µm); gás de arraste: hélio. As condições para a corrida cromatográfica estão descritas na tabela 5 e os gráficos referentes às curvas de calibração obtidas encontram-se nas figuras 13 e 14.

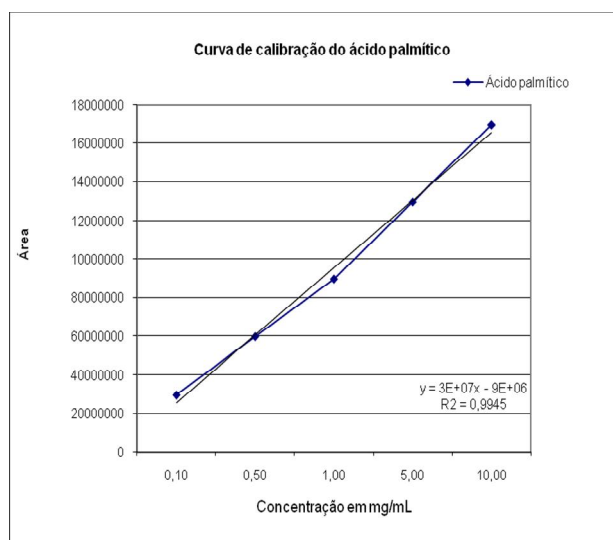


Figura 13. Curva de calibração do ácido palmítico

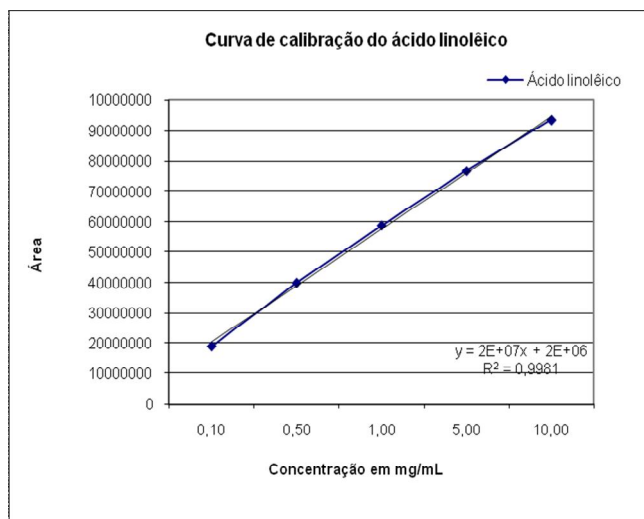


Figura 14. Curva de calibração do ácido linoléico.

3.3.3 Preparação do Material para Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

De acordo com o melhor perfil de resolução por cromatografia em camada fina (CCF), as sub-frações (Total n =29): 1, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 21,23, 29 provenientes do extrato acetato de etila (Tabela 4), foram selecionadas para posterior análise por CLAE (Tabela 6) em aparelho Shimadzu com 2 bombas LC-10AD, degaseificador DGU-12A, injetor automático SIL-10AD, forno de colunas CTO-10A. Os dados foram adquiridos por interface SCL-10A. Aquisição de dados e controle pelo software e Shimadzu CLASS-VP versão 6.145P1. As amostras foram diluídas em 150 µL de metanol exceto as amostras 1 e 3, para as quais foram acrescentados 150µl de água para solubilização total. O método gradiente adotado compreendeu diferentes proporções dos solventes A e B (solvente A: Solução aquosa de TFA 0,5% e solvente B: Acetonitrila) conforme tabela 6. A análise transcorreu em um tempo total de 55 minutos com fluxo de 1 mL /min.

Tabela 6: Condições pelo método gradiente por CLAE para análise das sub-frações provenientes do extrato acetato de etila de MD.

Varição do tempo em minutos (min)	Proporção de solvente B
0-2	Acetonitrila 3%
2-7	Acetonitrila 12%
7-12	Acetonitrila 25%
12-19	Acetonitrila 35%
19-24	Acetonitrila 35%
24-28	Acetonitrila 48%
28-32	Acetonitrila 48%
32-42	Acetonitrila 95%
42-50	Acetonitrila 100%
50-55	Metanol 100%

3.4. Avaliação da Atividade Antibacteriana dos Extratos e Constituintes Químicos das Espécies vegetais.

As amostras bacterianas que foram utilizadas neste trabalho pertencem a coleção de culturas do Laboratório de Infecção Hospitalar do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG) – UFRJ onde os testes para atividade antibacteriana foram realizados, sob supervisão da Prof.^a Dr.^a Ivana Correa Ramos Leal . As amostras clínicas foram obtidas a partir de diferentes fontes de isolamento de pacientes internados em diferentes hospitais brasileiros. O número das amostras, a fonte de isolamento e o perfil de susceptibilidade á oxacilina estão descritos nas tabelas 7, 8 e 9 à seguir.

Tabela 7. Características das amostras clínicas e 5 amostras de referência de *Staphylococcus* spp. utilizadas no presente estudo.

N.º da Amostra	Fonte de isolamento	Susceptibilidade à OXA
517a	Sangue	ORSA
520a	Sangue	ORSA
526a	Abscesso cutâneo	ORSA
527a	Lavado bronco-alveolar	ORSA
529a	Sangue	ORSA
551a	Ponta de cateter	ORSA
563a	Líquido pleural	ORSA
601a	Abscesso	ORSA
604a	Articulação	ORSA
621a	Swab nasal	ORSA
633a	Secreção de ouvido	ORSA
646a	Sangue	ORSA
664a	Ferida de pele	ORSA
920a	Líquido pleural	OSSA
1006a	Prótese	OSSA
1008a	Lavado bronco-alveolar	OSSA
1015a	Prótese	OSSA
1025a	Prótese	OSSA
29213*	-	OSSA
33591*	-	OSSA
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228*	-
<i>S. haemolyticus</i>	ATCC 29970*	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212*	-
<i>S. hominis</i>	ATCC 27844 *	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922*	-

OXA= Oxacilina

ORSA= *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina

OSSA= *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina

* ATCC= American Type Culture Collection

Tabela 8. Características de outras amostras de referência utilizadas no presente estudo.

N.º da Amostra	Espécie bacteriana
ATCC 27840	<i>Staphylococcus capitis</i>
ATCC 15442	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ATCC 27851	<i>Staphylococcus simulans</i>
DSM480	<i>Staphylococcus schleiferi</i>
JCSC1435	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ATCC 51299	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
OXA51	<i>Acinetobacter baumannii</i>
HON334	<i>Enterobacter</i>
ATCC 4352	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
ATCC 29009	<i>Acinetobacter spp</i>
ATCC 700603	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
ATCC 48695	<i>Acinetobacter baumannii</i>

ATCC= American Type Culture Collection

Tabela 9. Características das amostras clínicas e 1 amostra de referência de *Acinetobacter baumannii* utilizadas no presente estudo.

N.ºda Amostra	Fonte de isolamento	Susceptibilidade à Imipenen
OXA25	Sangue	IRAB
OXA38	Abscesso cutâneo	IRAB
OXA27	Secreção traqueal	IRAB
33AB	Sangue	IRAB
36AB	Sangue	IRAB
38AB	Secreção traqueal	IRAB
39AB	Urina	IRAB
55AB	Sangue	ISAB
60AB	Lavado broncoalveolar	ISAB
41AB	Secreção traqueal	ISAB
42AB	Urina	ISAB
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC48695*	-

IRAB *Acinetobacter baumannii* resistente à Imipenen

ISAB *Acinetobacter baumannii* sensível à Imipemen

* ATCC (American Type Culture Collection)

3.4.1. Método de Diluição em Ágar Müller-Hinton (NCCLS, 2010).

A atividade antibacteriana dos extratos das espécies vegetais, bem como das sub-frações pré-purificadas obtidas dos extratos hexânicos de MD e MA e diclorometânico de MA, foi verificada através do método de diluição em ágar, como preconizado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2010). Esta técnica tem como objetivo a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) da droga em estudo capaz de impedir o crescimento do micro-organismo.

Inicialmente, diluições seriadas do material vegetal seco foram realizadas a partir de uma solução estoque na maior concentração a ser investigada.

A concentração inicial trabalhada foi baseada em estudos da atividade antibacteriana de extratos vegetais previamente publicados por nosso grupo de pesquisa (MACHADO et al., 2005; LEAL et al., 2010; RUELA et al., 2011). Dessa forma, para os extratos e sub-frações optamos por investigar uma faixa de concentração variando entre 1024 e 128 µg/mL. Para tal, um volume de 2 ml da solução estoque (10,24 mg/mL em DMSO) das diferentes amostras vegetais foram carregados para um tubo contendo 2mL de água para o processo de diluição seriada, sendo este processo repetido até a obtenção da diluição final. Em seguida, 1mL de cada uma destas soluções obtidas foi adicionado a 19 ml do meio de cultura (ágar Müller-Hinton, DIFCO) ainda em fusão (diluição 1:20) e o material foi finalmente vertido em placas de Petri e homogeneizado previamente à solidificação.

Colônias bacterianas isoladas foram selecionadas e transferidas para solução salina a 0,85% até atingir uma turvação referente à escala 0,5 de McFarland (cerca de 10^8 UFC/mL). Posteriormente, essa solução foi diluída (1:10) em salina de forma a se obter cerca de 10^7 UFC/mL. A nova suspensão bacteriana obtida foi inoculada,

com auxílio do replicador de Steers nas placas contendo ágar Müeller-Hinton e as amostras nas diferentes concentrações (2048, 1024, 512, 256 e 128 µg/mL). A leitura dos resultados do teste foi realizada após incubação das placas em estufa a 35°C, por 24 h. Como controle positivo do teste, as amostras bacterianas avaliadas foram inoculadas em meio de cultura na ausência do material vegetal e em meio de cultura com adição de DMSO, solvente usado no preparo das amostras, para avaliação da interferência do mesmo.

3.5. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB) pelo Método de Diluição em Caldo

4.5.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Inicialmente, foi realizado o teste para verificação da CMI em caldo das sub-frações obtidas da filtração à vácuo do extrato em diclorometano ativo de *M. adansonii* Schott e a fração HXDL₅₀ ativa proveniente do extrato HX (MA). Para a investigação da CMI foi avaliada uma faixa de concentração de 128 µg/mL a 4096 µg/mL. Para obtenção das referidas diluições se partiu de uma solução estoque de 40960 µg/mL e, a partir desta, concentrações de 4096, 2048, 1024, 512, 256 e 128 µg/mL foram obtidas por diluições seriadas.

O inóculo bacteriano utilizado para o teste foi realizado a partir da amostra de *S.aureus* ATCC 29213, que foi transferida de uma cultura em ágar-sangue para um tubo contendo 5mL de caldo MH até obtenção de turvação correspondente a escala 0,5 de McFarland. Posteriormente, foram transferidos 100 µL dessa suspensão para um segundo tubo com 5 mL de caldo Mueller-Hinton (MH) (OXOID). Os caldos foram incubados por 4 - 6h a 35°C, sob agitação, e a turbidez ajustada até 0,5 da escala McFarland (10⁸ UFC/mL). Em seguida, foram transferidos 300µL desta

suspensão para um tubo contendo 9,7 mL de caldo MH (diluição 1:32), obtendo-se uma suspensão bacteriana com cerca de $4-5 \times 10^6$ UFC/mL. Finalmente, foram transferidos 100 μ L desta suspensão para cada tubo contendo 0,9 mL com a respectiva diluição contendo as sub-frações mencionadas, atingindo ao final uma concentração bacteriana de cerca de 5×10^5 UFC/mL.

Para verificação da interferência do solvente no crescimento bacteriano 100 μ L da suspensão bacteriana ($4-5 \times 10^6$ UFC/mL) e 100 μ L do solvente (DMSO) utilizado para solubilizar as amostras foram adicionados a um tubo contendo 0,9 mL de caldo MH (tubo C1). Um segundo tubo foi preparado com 0,9 mL de caldo MH e 100 μ L da suspensão bacteriana para controle do crescimento bacteriano (C2). O controle branco com 1 mL de caldo MH foi também utilizado neste ensaio (C3).

Todos os tubos foram incubados a 35°C, por 20h. Em seguida, estes tubos foram agitados cuidadosamente para que os micro-organismos do menisco migrem para todo o tubo, sendo posteriormente incubados por mais 4 horas. A leitura foi realizada e a CMI estabelecida como a menor diluição onde não foi verificado crescimento bacteriano.

3.5.2. Determinação da CMB

A concentração mínima bactericida (CMB) é a concentração da droga capaz de causar a morte de 99,9% de um inóculo bacteriano, devendo esta ser, no máximo, dois logs acima da concentração mínima inibitória (CMI) para ser considerada bactericida. Acima desse valor a droga é considerada bacteriostática (ISENBERG, 1992).

Para a determinação da CMB foram selecionados os tubos do ensaio anterior nas concentrações onde não se observou crescimento bacteriano. A partir desses,

100 µL foram pipetados em placas de ágar MH e espalhados com alça esterilizada. Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C por 24h.

4.6.2.a. Cálculo para determinação da CMB.

A partir do tubo controle (C2) foram retirados 100 µL e adicionados em 0,9mL de salina (diluição 1:10). Uma nova diluição 1:10 foi realizada seguida de uma terceira diluição 1:5 significando uma diluição total de $1/10 \times 1/10 \times 1/5 = 1:500$. Posteriormente, 100µL da suspensão final foram semeados em placa de Petri com agar MH. Partindo-se do princípio de que no tubo controle mencionado existe inicialmente cerca de 5×10^5 UFC/mL, e, que diversas diluições foram realizadas (1:500), a contagem do número de colônias final na placa de Petri foi feita baseada no seguinte cálculo:

$$\frac{5 \times 10^5 \text{ UFC/mL} \times 0,1\text{mL (alíquota)}}{500 \text{ (diluição)}} = \frac{5 \times 10^5 \text{ UFC/mL}}{5000} = 100 \text{ colônias}$$

Baseado nos cálculos realizados vislumbrou-se um crescimento de aproximadamente 100 colônias na placa referente ao tubo controle, devendo este valor ser, então, considerado para determinação da CMB. Vale ressaltar que, este valor corresponde a um inóculo inicial de exatamente 5×10^5 UFC/mL estimado na realização do presente ensaio. com a finalidade de determinar o inóculo exato presente inicialmente no tubo controle o número de colônias observado na placa referente ao tubo controle será contabilizado e, o valor encontrado submetido ao seguinte cálculo á seguir:

CÁLCULO FINAL: N.º de colônias x 5000= UFC/mL (inóculo inicial no tubo).

Considerando que a CMB é a concentração onde há morte de 99,9% dos organismos viáveis de uma cultura, é necessário calcular, a partir da contagem do

inóculo inicial, o valor correspondente ao número de colônias viáveis ao final do procedimento. Para este cálculo adotou-se: Inoculo inicial x 0,1mL (alíquota) x 0,001 (taxa de micro-organismos viáveis)= **N**, onde **N** é o número correspondente a 0,01% de células viáveis segundo contagem na placa controle. Assim, placas com número de colônias < **N** tem mais de 99,9% do crescimento bacteriano inibido. Dessa forma, a menor concentração onde este evento ocorre é a CMB. Vale ressaltar que, caso CMB = CMI ou até duas diluições acima, a substância pode ser considerada bactericida.

3.6. Curva de Crescimento da Amostra ATCC 29213 de *S. aureus* na Presença de Sub-fração Ativa do Extrato Hexânico de *M. adansonii* (De León e Moujir, 2008; Leal. I.C.R., 2007)

Este estudo tem como finalidade observar o perfil de crescimento da amostra padrão ATCC 29213 de *S. aureus* na presença de diferentes concentrações da sub-fração ativa (HXDL₅₀ proveniente do HX de MA). Para este estudo, a maior concentração avaliada foi baseada na CMI obtida pelo método de diluição em ágar. Avaliou-se cinco concentrações de cada fração para análise do crescimento bacteriano (CMI + 3 outras concentrações sub-CMI).

Nesta etapa foi utilizada a amostra bacteriana ATCC 29213 de *S.aureus*, previamente cultivada em caldo TSB (“Tryptic soy broth”) à 35°C até apresentar turvação correspondente à escala 0,5 McFarland (10⁸ UFC/mL). Para a realização do ensaio, 300 µL dessa suspensão bacteriana foram adicionados em tubos contendo 2,7 mL de caldo TSB, atingindo uma concentração final de 10⁷ UFC/mL. Desta nova solução bacteriana foram carregados 75 µL para um novo tubo contendo 3 mL de caldo TSB, o qual foi incubado por 1h na ausência da sub-fração em

análise, sendo a adição desta (300 uL) realizada em seguida e, a turbidez, medida a cada 1 hora. A absorvância da suspensão foi medida em Espectrofotômetro (Milton Roy Company, modelo Spectronic 20D) a 600 nm, sendo, primeiramente, a transmitância ajustada até o valor de 100 com o tubo em branco (sem inóculo bacteriano, somente contendo caldo TSB). Em seguida, o seletor do aparelho foi alterado para absorvância e, a leitura inicial dos demais tubos contendo as amostras foi processada. Os intervalos de leitura foram feitos a partir do tempo zero e, de uma em uma hora, sendo realizada durante um período de incubação total de 8 horas, a 35°C. Um controle do crescimento bacteriano foi preparado utilizando as mesmas condições acima (3 mL de caldo TBS + 75 ul de solução bacteriana), porém sem a adição das frações vegetais. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos através da curva de crescimento bacteriano (Abs600 versus tempo (h)) para cada amostra em quatro concentrações diferentes.

3.7. Curva de Morte da Amostra ATCC 29213 de *S.aureus* na Presença da Sub-Fração Ativa do Extrato Hexânico de *M. adansonii* (De León e Moujir, 2010)

A curva de morte é utilizada para um estudo da cinética de morte bacteriana na presença de agentes antimicrobianos. Foi utilizada a amostra bacteriana ATCC 29213 de *S.aureus*, previamente cultivada a 35°C em 3 ml de caldo TSB (“Tryptic soy broth”). Realizou-se a diluição em 3 ml de caldo TBS, até apresentar turvação correspondente à escala 0,5 McFarland (10^8 UFC/mL). Para a realização do ensaio, 300 µL dessa suspensão bacteriana foram adicionados em tubos contendo 2,7 mL de caldo TSB, atingindo uma concentração final de 10^7 UFC/mL. Desta nova solução bacteriana foram carregados 20 µL para cada poço de

uma placa de 96 poços (10^6 UFC/mL), a qual foi incubada a 35°C na presença da sub-fração em análise nas concentrações 2x o CMI ($2048\mu\text{g/mL}$).

O experimento foi planejado conforme a seguir:

- Coluna A (1-3) = $180\mu\text{L}$ TBS + $20\mu\text{L}$ sol. bact. = **controle do inoculo** (C1)
- Coluna A (4-6) = $200\mu\text{L}$ TBS = **controle do meio** (C2)
- Coluna B (1-5) = $160\mu\text{L}$ TBS + $20\mu\text{L}$ sub-fração + $20\mu\text{L}$ sol. bact. = **2X CMI**

Volume final/poço = $200\mu\text{L}$

Os intervalos de contagem em placa foram feitos a partir do tempo zero e, 1h, 2h, 4h e 24h, a 35°C . O crescimento bacteriano foi monitorado através de contagem de células viáveis em placa de ágar nutriente (Mueller-Hinton). A semeadura em placa de ágar MH é feita pipetando $100\mu\text{L}$ de cada poço de suspensão teste ou controle, que serão espalhados na superfície da mesma utilizando alça estéril. As placas de ágar MH foram incubadas à $35^\circ\text{C}/24\text{h}$.

Diluição para plaqueamento: a partir do poço controle (C1) foram retirados $100\mu\text{L}$ e adicionados em $0,9\text{mL}$ de salina (diluição 1:10). Uma nova diluição 1:10 foi realizada seguida de uma terceira diluição 1:10 significando uma diluição total de $1/10 \times 1/10 \times 1/10 = 1:1000$. Posteriormente, $100\mu\text{L}$ da suspensão final foram semeados em placa de Petri com agar MH. Partindo-se do princípio de que no tubo controle mencionado havia inicialmente cerca de 10^6 UFC/mL, e, que diversas diluições foram realizadas (1:1000), a contagem do número de colônias na placa de Petri foi feita baseada no seguinte cálculo:

$$\frac{10^6 \text{ UFC/mL} \times 0,1 \text{ mL (alíquota)}}{1000 \text{ (diluição)}} = \frac{10^6 \text{ UFC/mL}}{10000} = 100 \text{ colônias (aproximadamente)}$$

Para se conhecer a concentração da suspensão bacteriana no tubo teste, adotou-se o seguinte cálculo: **N.º de colônias x 10000 = UFC/mL (inóculo inicial no tubo).**

3.8. Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método do DPPH

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) é um radical livre, utilizado para avaliação da capacidade antioxidante. Considerado, um dos métodos mais utilizados para medir o teor de antioxidantes naturais como vegetais e grãos de trigo. Este ensaio baseia-se no princípio de que o radical DPPH recebe um hidrogênio da molécula antioxidante resultando em redução do DPPH (Radical livre) para DPPH (Reduzido) como mostra a figura 15. Na reação ocorre a mudança da cor violeta para o amarelo, a qual é monitorada por espectrofotometria (MISHRA et al., 2012).

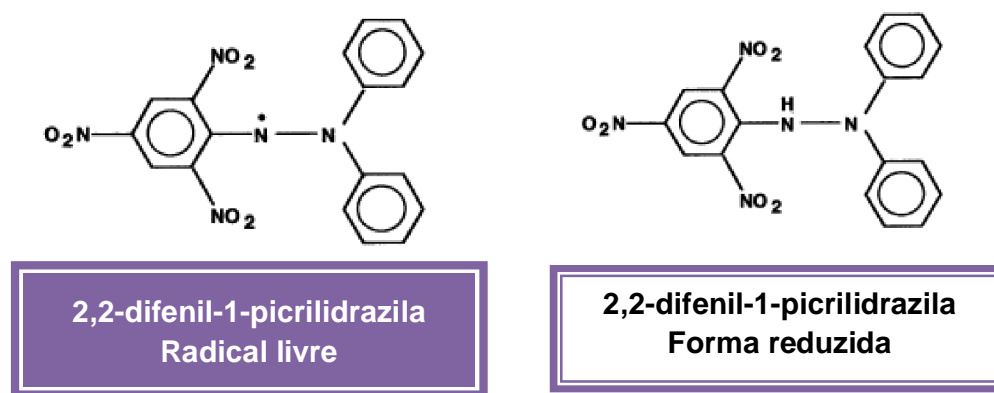


Figura 15. Reação de redução do DPPH por espécies antioxidantes (Molyneux, 2004)

Seguindo a metodologia de Mensor e colaboradores (2001), foram preparadas soluções estoque do extrato etanólico bruto e das frações originadas da partição líquido x líquido, em concentração igual a 1 mg/mL usando etanol como solvente. A atividade antioxidante é determinada adicionando 1 ml de solução de DPPH 0,3 mM (2,2-difenil-1-picrilidrazila; Sigma®) a 2,5 ml da solução de cada amostra (A) diluída em etanol nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 125 e 250 e 500 µg/mL. Nos brancos

(B), em lugar do DPPH, adiciona-se apenas 1 ml de etanol aos extratos diluídos nas mesmas concentrações das amostras. O controle negativo (C) é preparado com 1 ml de DPPH e 2,5 ml de etanol. As reações transcorreram a temperatura ambiente durante 30 minutos. Em seguida, foram feitas as leituras de absorvância a 518 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV-2200, com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm QS Hellma®. Os valores das absorvâncias foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AAO%) conforme a fórmula abaixo:

$$AAO\% = 100 - \{[(ABS_A - ABS_B) \times 100] / ABS_C\}$$

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em valores de CE_{50} , concentração efetiva para obter 50% da atividade antioxidante máxima, estimada em 100%. O extrato padronizado de Ginkgo biloba EGb 761® foi usado como padrão de alta capacidade antioxidante, sendo testado nas mesmas condições descritas acima (VICENTINO & MENEZES, 2007).

3.9. Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método de Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC)

A avaliação da atividade antioxidante pelo método ORAC foi determinada de acordo com o método de Stockham et al. (2011) com pequenas modificações. Nesse ensaio foram avaliados o extrato etanólico bruto e as frações provenientes da partição líquido x líquido de MD e MA. O ensaio é baseado na determinação da atividade antioxidante através da reação de oxidação da fluoresceína, onde componentes geradores de radicais livres inativam a fluoresceína, diminuindo sua fluorescência. A atividade antioxidante da substância a ser testada será determinada pela capacidade de inibir a oxidação da fluoresceína, medindo-se ao longo do tempo a quantidade de fluorescência emitida.

As amostras foram preparadas nas seguintes concentrações em PBS: 0,25; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5 e 15 µg/mL. Em cada amostra (20µl), foram adicionados 120µl de fluoresceína (Isofar). As soluções foram incubadas à 37°C por 10 minutos. Após a incubação, foram adicionados 60 µL de AAPH (2,2'-azobis-2-metil-propanimidamida,dihidrocloreto) (ALDRICH®). Em seguida, a microplaca de 96 poços (SPL- Labiotec) foi novamente incubada a 37°C por 1 hora e 35 minutos. A absorvância foi medida em fluorímetro Fluostar Optima BMG- LABTECH. Para verificar a interferência das amostras, o branco foi preparado com PBS (20 µl), 120 µL de fluoresceína e 60 µL de AAPH. Um controle contendo PBS (80 µl) e 120 µL de fluoresceína também foi preparado. Uma solução de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) (Aldrich®) foi usado como padrão de alta capacidade antioxidante, sendo testado nas mesmas condições e concentrações descritas acima.

3.10. Avaliação da Capacidade Quelante do Íon Ferroso

A capacidade quelante de ferro foi determinada de acordo com o método de Wang e colaboradores (2009) com pequenas modificações. Nesse ensaio foram avaliados o extrato etanólico bruto e as frações provenientes da partição líquido x líquido de MD e MA. As amostras foram preparadas nas seguintes concentrações em etanol: 0,1; 1; 10; 100 e 1000 µg/mL. 100 µl de cada amostra foram adicionados à 140 µl de solução aquosa de FeCl₂ 2 mM (MERCK®). A reação foi iniciada pela adição de 10 µl de ferrozina 5 mM (SIGMA-ALDRICH®). As soluções foram mantidas sob agitação durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, a absorvância foi medida em leitor de microplacas a 562 nm (Biot-Tek Instruments Inc., modelo µQuant). Para verificar a interferência das amostras, o branco foi preparado com água destilada (10 µl) em substituição à solução de

ferrozina e, 100 µl água destilada em substituição à solução de amostra foi utilizada como controle. Os padrões de quercetina (Merck®; 0,1; 1; 10; 100 e 1000 µg/mL) e EDTA-Na₂ (Sigma-Aldrich®; 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 µg/mL) foram usados como controle positivo nas mesmas condições usadas para as amostras. Todos os testes foram realizados em triplicata. A capacidade quelante de íons ferrosos (CQFe) foi calculada em percentagem de acordo com a equação:

$$\text{CQFe (\%)} = [1 - (\text{AA} - \text{AB}) / \text{AC}] \times 100 .$$

3.11. Avaliação da Toxicidade In-vitro do EH e da Sub-fração Ativa HXDL₅₀ de MA (Sabino et al., 1999).

Células BCS-40 (epitélio de rim de macaco verde africano) foram semeadas em placas de cultura 96 poços e incubadas por 24h. Foram preparadas soluções estoques do extrato hexânico e da sub-fração hexano/diclorometano de MA em concentrações de 2048, 1024, 512, 256, 128 e 64 µg/mL. Para controle do meio, foi utilizado meio de cultura (DMEM com soro fetal bovino 5%) e as células BCS-40. Para controle do solvente utilizou-se o veículo DMSO 0,5% e as células BCS-40. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, 5% CO₂ por 24hs. Após o tempo desejado, preparou-se a solução de *Neutral Red* a uma concentração desejada de 100 µg/mL sendo adicionado 100 µL em cada poço (já contendo 100 µL de meio), atingindo uma concentração final de *Neutral Red* de 50 µg/mL; Cobriu-se a placa com papel laminado e colocou-se na estufa por 3 horas; Em seguida, retirou-se a placa da estufa e fixou-se as células com formaldeído 4% por 1 minuto (para 1 placa: 1,3mL formol 37% + 10,7mL pbs); Extraiu-se o *Neutral Red* com metanol:ácido acético por 20 minutos, sendo as placas agitadas no escuro à temperatura ambiente.

(para 1 placa: 6mL metanol + 5,9 mL PBS + 120uL ác. acético); A leitura foi realizada em leitor de Elisa a 490 nm .

3.12. Avaliação da Toxicidade Aguda do Extrato Hexânico

A toxicidade aguda é definida pela Organização de Cooperação Econômica e Guias de Desenvolvimento como o conjunto de efeitos adversos em curto espaço de tempo após administração oral de uma única dose de uma substância ou múltiplas doses dadas em 24 h. Este ensaio foi adotado segundo Sabino et al. (1999), com pequenas modificações, para avaliação do extrato hexânico que apresentou importante atividade antibacteriana. O teste de avaliação da toxicologia aguda do extrato hexânico foi realizado utilizando camundongos da linhagem SW, fêmeas, com 6 meses de vida e peso corporal entre 20-30 g. Os animais foram procedentes do Biotério do IBRAG na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), e os testes realizados de acordo com as normas estabelecidas para o uso de animais em pesquisa, segundo protocolo experimental (protocolo nº 05/2009) aprovado pelo Comitê de Ética do Centro Biomédico do IBRAG- UERJ. Durante o teste, os animais foram mantidos a temperatura ambiente de 25°C e com livre acesso a água e alimento (ad libitum). Os animais foram divididos em seis grupos de cinco camundongos. Cada um dos cinco grupos teste recebeu dose única (100 µL), administrada por gavagem (via oral), de uma solução aquosa nas doses finais de 100, 500, 1000, 3000 e 5000 mg/kg, respectivamente, e o grupo controle recebeu água estéril apenas. Os animais foram observados três vezes ao dia para verificação de mortalidade e sinais clínicos, durante 7 dias. Ao final do experimento, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. A via oral foi selecionada em função de ser a via utilizada popularmente. O exame clínico, de acordo com Chan & Hayes (1994),

consistiu nas observações de alterações relacionadas à farmacotoxicidade em diferentes sistemas, como: na pele (edema e eritema), olhos (miose e midríase), sistema respiratório (dispnéia), sistema circulatório (taquicardia/ bradicardia e vasodilatação), sistema gastrointestinal (diarréia e obstipação), sistema nervoso central e autônomo (tremor, convulsão, salivação, diurese e sonolência), atividade motora (letargia).

3.13. Análise Estatística

Os testes in vitro foram realizados em triplicata e os resultados representam a média \pm desvio padrão de três ensaios independentes. A comparação entre os dados foi feita utilizando o software Statistica Stat Soft, através dos testes t de S-student, considerando a diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Processo de Partição Líquido-Líquido

Um total de 40 g de extrato etanólico bruto de *M. deliciosa* (MD) e *M. adansonii* (MA) foram submetidos a um processo de partição líquido x líquido, tendo sido obtidos 13,7 g (MD) e 11,3 g (MA) da fração em hexano (HX); 4,2 g (MD) e 2,8 g (MA) da fração em diclorometano (DCL); 1,5 g (MD) e 0,40 g (MA) da fração em acetato de etila (ACET); 5,7 g (MD) e 4,1 g (MA) da fração butanólica (Bu) e 11,4 g (MD) e 14,2 g (MA) do resíduo em água (AQ) como mostra a tabela 10.

Tabela 10: Rendimentos dos extratos vegetais obtidos pela partição líquido-líquido.

Solventes	Rendimento de MD (g)	%	Rendimento de MA (g)	%
BR	40		40	
HX	13,7	34,2	11,3	28,25
DCL	4,2	10,5	2,8	7,0
ACET	1,5	3,7	0,40	1,0
BU	5,7	14,2	4,1	10,25
AQ	11,4	28,5	20,3	50,75

4.2. Pré-purificação do Extrato Hexânico de *M.deliciosa* e dos Extratos Hexânico e Diclorometânico de *M. adansonii*.

5.2.1. Sub-frações dos Extratos Hexânicos de MA e MD.

Esta etapa teve como objetivo a pré-purificação e comparação do perfil químico dos constituintes majoritários presentes nos extratos hexânicos (HX) de *M. deliciosa* e *M. adansonii* uma vez que o extrato HX de MA apresentou importante atividade antibacteriana (item 5.6) enquanto o extrato HX de MD mostrou-se inativo.

Dessa forma, foi realizada uma filtração à vácuo com os extratos HX de MA (2g) e do extrato HX de MD (2 g), com solventes de polaridade crescente. Os rendimentos para cada sub-fração obtida a partir da referida metodologia estão dispostos nas tabelas 11, 12a e 12b abaixo.

Tabela 11. Características da filtração à vácuo do extrato hexânico de *Monstera deliciosa* Liebm

Código das sub-frações	Rendimentos (g)	Rendimentos (%)
HX₁₀₀	0,069	3,4
HXDL₅₀	0,372	18,6
DL₁₀₀	0,794	39,7
DLAC₅₀	0,085	4,2
AC₁₀₀	0,035	1,7
ACME₅₀	0,492	24,5
ME₁₀₀	0,032	1,5

Tabela 12a. Características da filtração à vácuo do extrato hexânico de *Monstera adansonii* Schott (1ª)

Código das sub-frações	Rendimentos (g)	Rendimentos (%)
HX₁₀₀	0,016	0,7
HXDL₅₀	0,727	36,3
DL₁₀₀	0,111	5,5
DLAC₅₀	0,264	13,2
AC₁₀₀	0,037	1,8
ACME₅₀	0,558	27,9
ME₁₀₀	0,064	3,2

Tabela 12b. Características da filtração à vácuo do extrato hexânico de *Monstera adansonii* Schott (2ª)

Código das sub-frações	Rendimentos (g)	Rendimentos (%)
HX₁₀₀	0,006	0,3
HXDL₅₀	0,572	28,5
DL₁₀₀	0,294	14,7
DLAC₅₀	0,264	11,6
AC₁₀₀	0,094	4,7
ACME₅₀	0,411	20,5
ME₁₀₀	0,119	5,9

4.2.2. Sub-frações do Extrato em Diclorometano de MA.

A fração em DCL de MA também apresentou importante atividade antibacteriana frente às amostras de *Acinetobacter baumannii* (item 5.6, Tabela 19), tendo sido também, dessa forma, submetido ao processo de pré-purificação (1,5 g) pela técnica de filtração à vácuo. Os rendimentos para cada sub-fração obtida estão dispostos na tabela 13 à seguir.

Tabela 13. Características da filtração à vácuo do extrato em diclorometano de *Monstera adansonii* Schott

Código das sub-frações	Rendimentos (g)	Rendimentos (%)
HX₁₀₀	1,183	36,64
HXDL₅₀	0,174	11,5
DL₁₀₀	0,131	8,7
DLAC₅₀	0,018	1,2
AC₁₀₀	0,130	8,6
ACME₅₀	0,119	7,9
ME₁₀₀	0,156	10,3

4.3. Pré-purificação do extrato em acetato de etila de MD por SPE (solid phase extraction).

Foi realizado um processo de fracionamento do extrato em acetato de etila de MD por SPE uma vez que este apresentou importante atividade antioxidante. O método gradiente foi adotado utilizando uma solução aquosa de TFA 0,5% e acetonitrila. Os rendimentos das sub-frações obtidas pela referida metodologia estão dispostos na tabela 14.

Tabela. 14: Rendimento das sub-frações obtidas a partir do extrato em acetato de etila de MD através da extração por SPE.

Códigos das sub-frações	Rendimento (mg) de cada sub-fração	Rendimento total em % das amostras
1, 2, 3	18; 0,2; 2,4	20,6
4, 5, 6	3,4; 2,8; 2,2	9,4
7, 8, 9, 10, 11	3,5; 3,5; 2,3; 2,3; 3,3	11,6
12, 13, 14, 15	3,9; 3,3; 2,9; 2,2	12,3
16, 17, 18, 19, 20	3,4; 2,5; 1,7; 2,7; 1,1	11,4
21, 22, 23	2,4; 1,3; 3,5	7,2
24, 25, 26, 27	0,8; 2,0; 1,7; 2,1	8,0
28, 29	3,5; 3,0	6,5

4.4. Análise Química das Sub-frações dos Extratos Hexânicos de *Monstera adansonii* por Cromatografia em Fase Gasosa

5.4.1. Fração HXDL₅₀

A análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas das sub-frações HXDL₅₀ derivadas dos extratos hexânicos de MA (sub-

fração ativa) e MD (sub-fração não ativa) identificou a presença dos ácidos graxos palmítico, linoléico e linolênico. Já existem estudos descrevendo a presença de ácidos graxos em plantas da família Araceae, como a presença de ácidos fenilalcanóicos em diferentes espécies (MEIJA & SOUKUP, 2004). A partir do óleo da espécie *Dracunculus vulgaris*, por exemplo, foram identificados os ácidos palmítico, oléico e linolênico em sua composição (REZANKA et al., 2011).

A análise do perfil de fragmentação por CG-EM dos picos referentes à fração HXDL₅₀ de MA, sub-fração mais ativa (item 5.7) permitiu a caracterização de três ésteres metílicos como substâncias majoritárias, com tempos de retenção que variaram entre 17,6 a 19,3 minutos (Figura 16, pág. 76), a saber:

- Éster etílico do ácido hexadecanóico (ÁCIDO PALMÍTICO) (39,29%)* (majoritário)– Tempo de retenção: 17,59 min. Perfil de fragmentação: (m/z): 284 [M]⁺, 241, 213, 185, 157, 101, 88 (Figura 17, pág 76).
- Éster etílico do ácido cis- 9-12 octadecenoato de etila (ÁCIDO LINOLÊICO) (32,43%)*– Tempo de retenção: 19,25 min. Perfil de fragmentação: (m/z): 308 [M]⁺, 262, 178, 164, 150, 135, 121, 109, 95, 81, 67, 55 (Figura 18, pág 76).
- Éster metílico do ácido 9,12,15 octadecatrienóico (ÁCIDO LINOLÊNICO) (25,94%)* –Tempo de retenção: 19,33 min. Perfil de fragmentação: (m/z): 292 [M]⁺, 149, 135, 121,108, 93, 79, 67, 55, 41 (Figura 19, pág 77).

*Os percentuais calculados foram baseados na área relativa obtida.

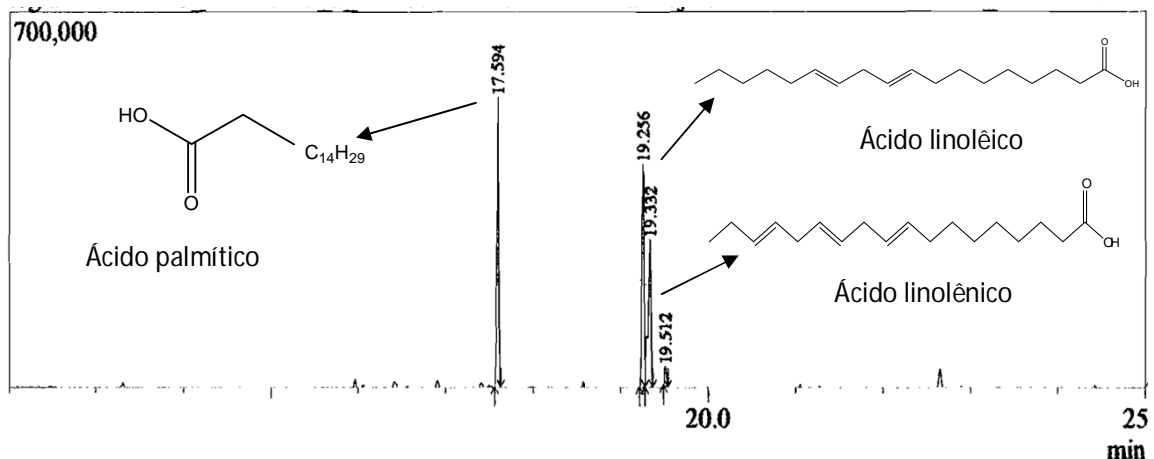


Figura 16. Cromatograma obtido pela técnica por CG-EM da fração HXDL₅₀.

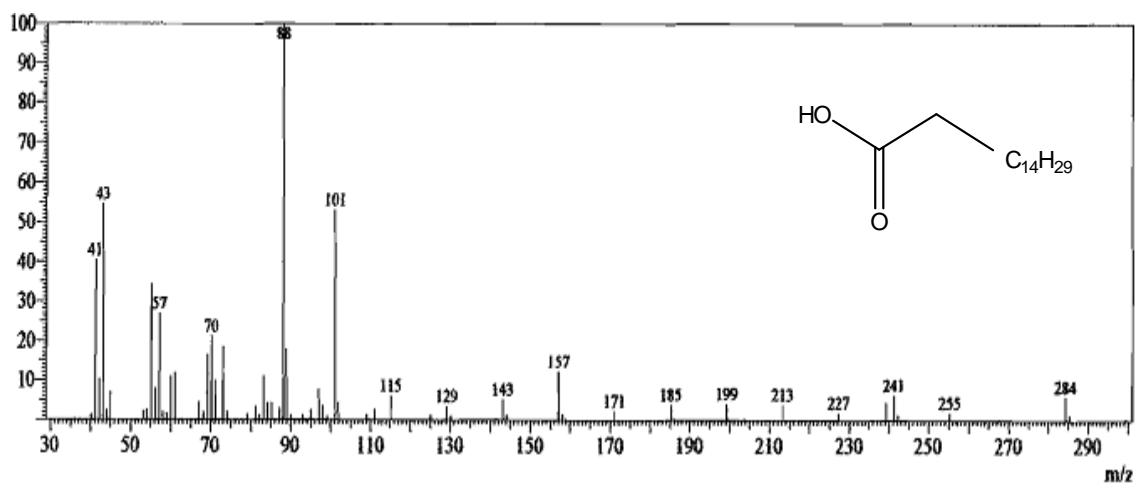


Figura 17- Espectro de massas referente ao sinal com tempo de retenção de 17,59 minutos (Ácido palmítico) obtido a partir da análise da fração HXDL₅₀ por CG-EM.

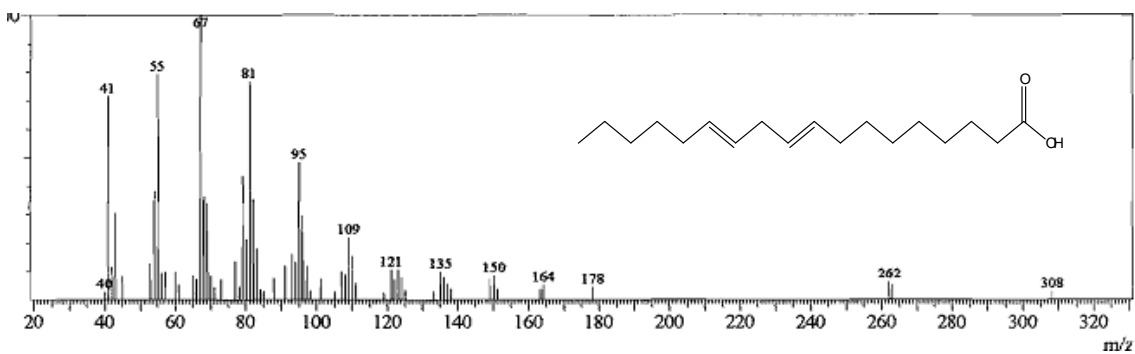


Figura 18. Espectro de massas referente ao sinal com tempo de retenção de 19,25 minutos (Ácido linolênicos) obtido a partir da análise da fração HXDL₅₀, por CG-EM.

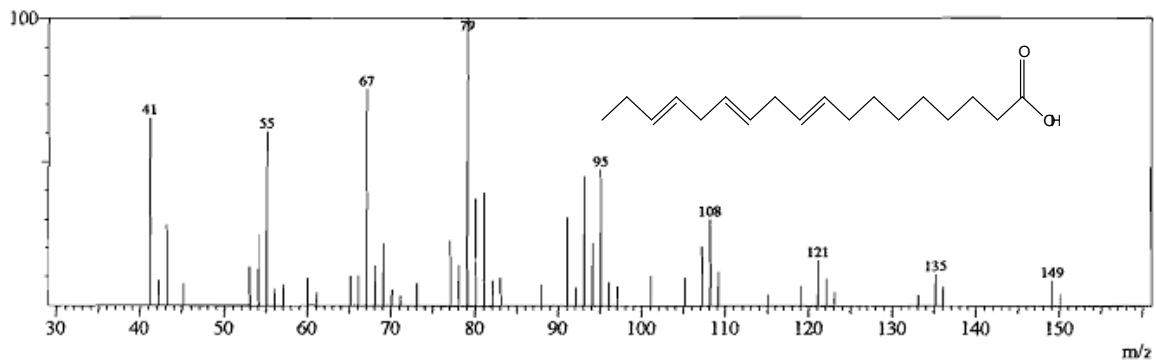


Figura 19. Espectro de massas referente ao sinal com tempo de retenção de 19,33 minutos. (Ácido linolênico) obtido a partir da análise da fração HXDL₅₀ CG-EM.

4.4.2. Fração DL₁₀₀

A análise do perfil de fragmentação por CG-EM dos picos referentes à fração DL₁₀₀ permitiu a caracterização do derivado trimetilsilil do ácido palmítico, bem como do ácido sebácico e de um esteróide, como substâncias majoritárias. Os tempos de retenção destas estruturas variaram de 17,31 a 24,57 minutos (Figura 20, pág 78), a saber:

- Éster trimetil-silil do ácido hexadecanóico (ÁCIDO PALMÍTICO) (30,86%)* – Tempo de retenção: 18,05 min. Perfil de fragmentação: (m/z): 313, 145, 132, 117, 73. (Figura 21, pág 78)
- Esteróide (4,86%)* – Substância sugerida: Androstan-3-ona. Tempo de retenção: 23,89 min. Perfil de fragmentação (m/z): 281, 227, 207, 173, 105, 81 (Figura 22, pág 78).
- Éster 2-etil-hexil do ácido decanedióico (ÁCIDO SEBÁCICO) (6,84%)* - Tempo de retenção: 24,86 min. Perfil de fragmentação: (m/z): 297, 185, 112, 70, 57 (Figura 23, pág 79).

*Os percentuais calculados foram baseados na área relativa obtida.

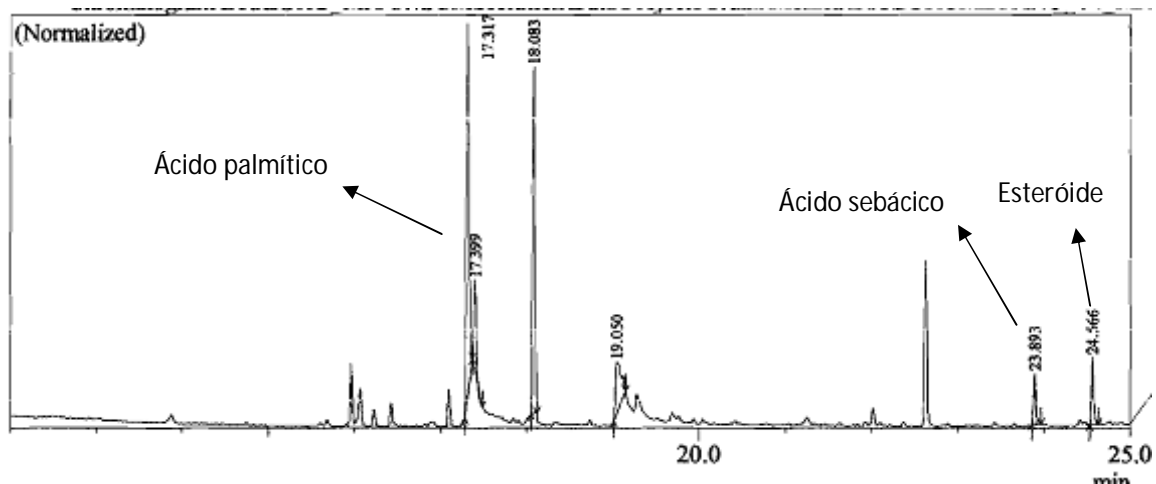


Figura 20. Cromatograma da Fração DL₁₀₀ obtido pela técnica de CG-EM.

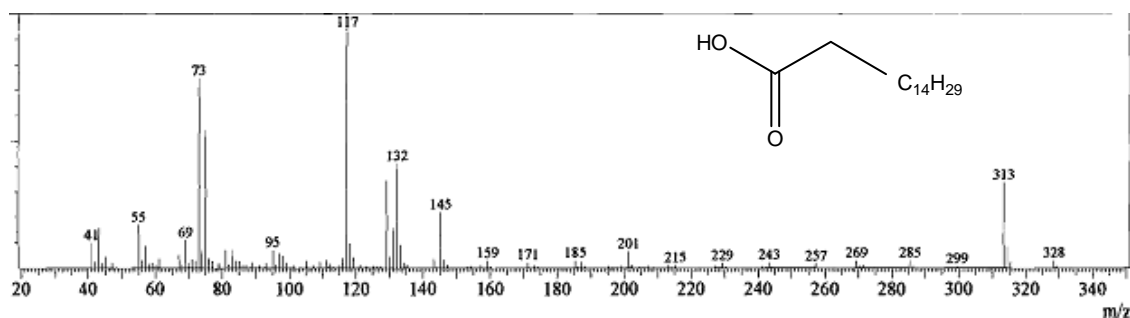


Figura 21. Espectro de massas referente ao sinal com tempo de retenção de 18,08 minutos (Ácido palmítico) obtido a partir da análise da fração DL₁₀₀ por CG-EM.

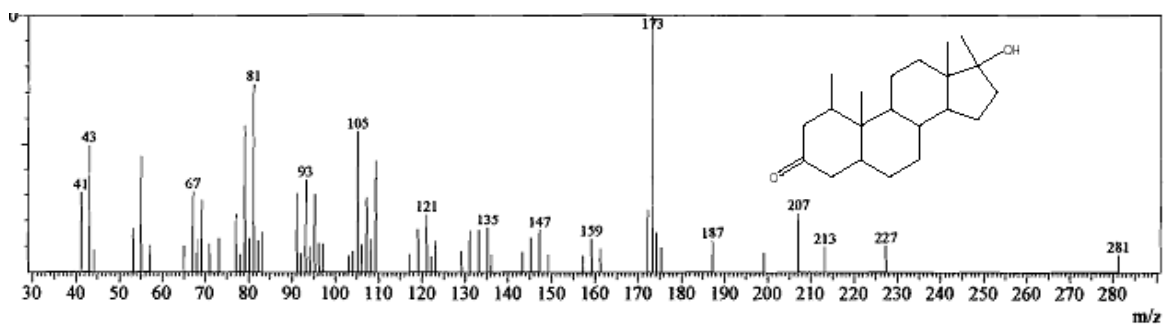


Figura 22. Espectro de massas referente ao sinal com tempo de retenção de 23,89 minutos (Esteróide) obtido a partir da análise da fração DL₁₀₀ por CG-EM.

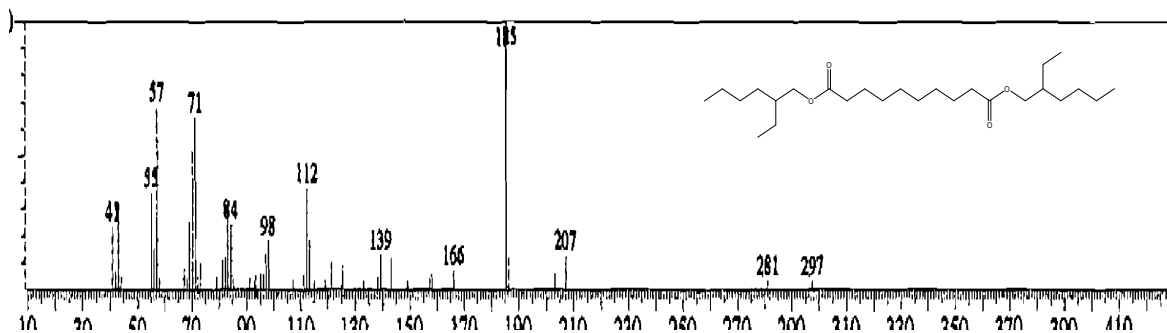


Figura 23. Espectro de massas referente ao sinal com tempo de retenção de 24,56 minutos (ácido sebáico) obtido a partir da análise da fração DL₁₀₀ por CG-EM.

4.4.3. Fração DLAC₅₀

A análise do perfil de fragmentação por CG-EM dos picos referentes à fração DLAC₅₀ permitiu a caracterização do ácido palmítico como substância majoritária (61,42%)* com tempo de retenção de 18,09 minutos (Figura 24).

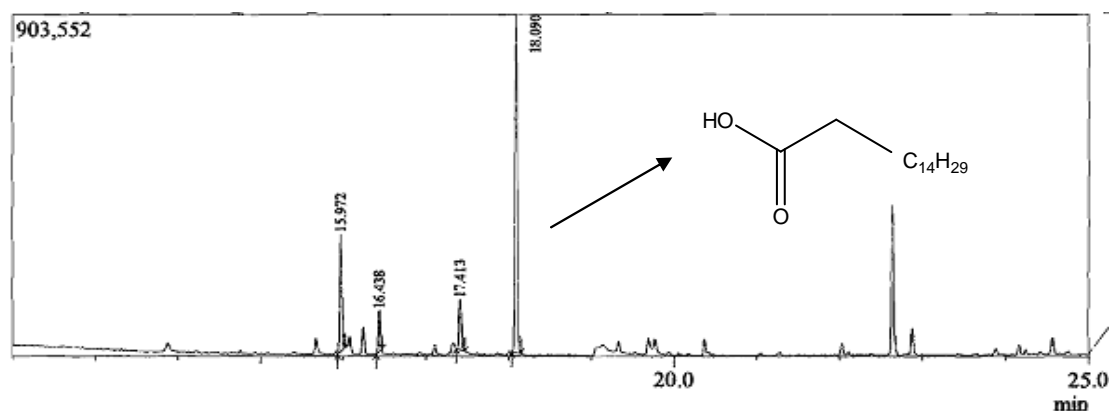


Figura 24. Cromatograma da fração DLAC₅₀ obtido pela técnica por CG-EM.

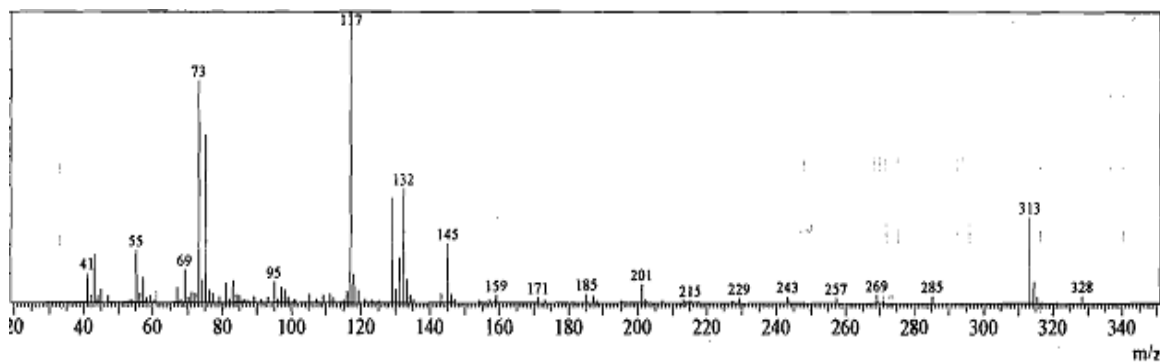


Figura 25- Espectro de massas referente ao sinal com tempo de retenção de 18,09 minutos (ácido palmítico) obtido a partir da análise da fração por CG-EM.

Tanto a fração HXDL₅₀, quanto as frações DL₁₀₀ e DLAC₅₀ apresentaram um cromatograma que reflete a presença do ácido palmítico, o qual é bastante reconhecido na literatura por exibir importante atividade antibacteriana. Entretanto, vale ressaltar que a fração HXDL₅₀ foi a única fração que mostrou atividade antibacteriana importante nas condições avaliadas, o que pode ser explicado pelo efeito sinérgico deste ácido na presença dos ácidos linolênico e linoléico. Um estudo de Dilika e colaboradores (2000) corrobora esta explicação, pois os ácidos oléico e linolêico, presentes nas folhas de *Helichrysum pedunculatum* foram responsáveis pela atividade antibacteriana frente à *Micrococcus kristinae* e *S. aureus* na concentração de 1000 µg/mL quando testados isoladamente. Porém, quando administrados em combinação, a CMI reduziu para 50 µg/mL, indicando um forte sinergismo entre esses ácidos. Oliveira et al., (2008) & Kosina et al., (2010) também identificaram a presença dos ácidos linoléico e palmítico juntamente a outros ácidos graxos no fruto *Corylus avellana L.* e na espécie vegetal *Macleaya cordata*, ambas apresentaram atividade antibacteriana frente a várias cepas gram-positivas. Nosso estudo não só confirma os resultados descritos na literatura, como também mostra melhor atividade para a sub-fração HXDL₅₀, que apresentou atividade inibitória na concentração de 1024µg/mL frente a 48% de todas as amostras de *Staphylococcus* spp. testadas.

4.4.4. Análise Química da Fração Ativa HXDL₅₀ (*Monstera adansonii*) x HXDL₅₀, Inativa (*Monstera deliciosa*).

Apenas a sub-fração HXDL₅₀ proveniente de HX de MA apresentou atividade antibacteriana (item 5.6). A análise por CG-EM mostrou que, apesar da fração HXDL₅₀ de MD também ter revelado picos referentes a presença dos ácidos

palmítico, linoléico e linolênico, as proporções destes na referida sub-fração apresentou-se pequena comparada a fração HXDL₅₀ de MA. Para o ácido palmítico observou-se um percentual de área relativa de cerca de 12,22%, enquanto que, para os demais ácidos este percentual relativo foi de aproximadamente 29,60%, no total. O percentual relativo restante de 58,18% mostrou-se relativo a presença de hidrocarbonetos de cadeia longa. Dessa forma, podemos observar que, a presença majoritária (97,66%) dos referidos ácidos na sub-fração HXDL₅₀ de *Monstera adansonii* (Figura 26) foi fundamental para se observar a atividade antibacteriana frente às amostras testadas (Item 4.4).

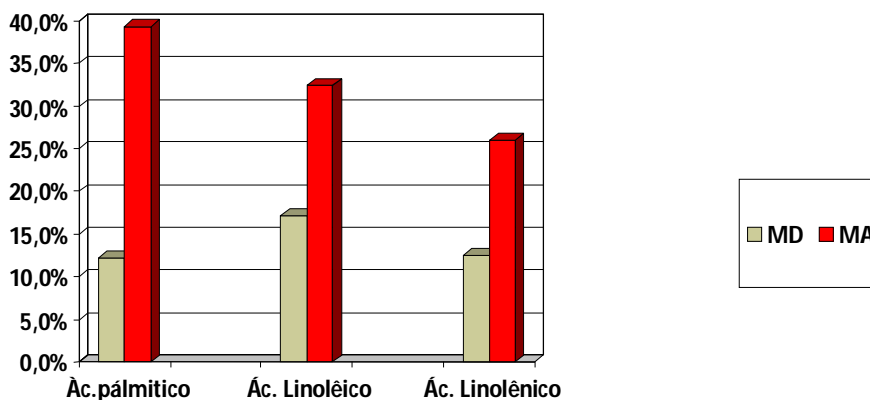


Figura 26. Percentual de área relativa dos ácidos palmítico, linoléico e linolênico na sub-fração HXDL₅₀ (*Monstera deliciosa*) X HXDL₅₀ (*Monstera adansonii*)

4.4.5 Curva de Calibração para Quantificação dos Ácidos Graxos.

De acordo com a tabela 15 à seguir, a quantidade de ácido palmítico e ácido linoléico da sub-fração HXDL₅₀ de MA é maior do que na sub-fração HXDL₅₀ de MD. A sub-fração HXDL₅₀ de MA apresentou 0,52 mg/mL de ácido palmítico, enquanto a sub-fração HXDL₅₀ de MD apresentou apenas 0,38 mg/mL. O mesmo foi observado

para o ácido linoléico presente na sub-fração HXDL₅₀ de MA, uma vez que este foi quantificado em concentração maior (0,29 mg/mL) do que na sub-fração inativa HXDL₅₀ de MD (apenas 0,09 mg/mL). As sub-frações DLC₁₀₀ e DCLAC₅₀ também foram quantificadas em relação ao teor de ácido palmítico, tendo sido verificado teores de 0,37 mg/mL e 0,35 mg/mL, respectivamente. Esses valores corroboram, mais uma vez, a importância da concentração de ácido palmítico na fração ativa para se verificar atividade antibacteriana. Constatou-se ainda que, para se observar o efeito sinérgico, também é desejável uma concentração mínima dos ácidos.

Tabela 15: Quantificação dos ácidos graxos presentes na sub-fração HXDL₅₀

Sub-frações	Ácido palmítico	Ácido linoléico
HXDL₅₀ de MD	0,38 mg/mL	0,09 mg/mL
HXDL₅₀ de MA	0,52 mg/mL	0,29 mg/mL
DCL₁₀₀	0,37 mg/mL	----
DCLAC₅₀	0,35 mg/mL	----

Considerações gerais

Tanto a fração HXDL₅₀, quanto as frações DL₁₀₀ e DLAC₅₀ apresentaram um cromatograma que reflete a presença do ácido palmítico, o qual é bastante reconhecido na literatura por exibir importante atividade antibacteriana. Entretanto, vale ressaltar que a fração HXDL₅₀ foi a única fração que mostrou atividade antibacteriana importante nas condições avaliadas, o que pode ser explicado pelo efeito sinérgico deste ácido quando na presença dos ácidos linolênico e linoléico. A sub-fração HXDL₅₀ de MD também apresentou os ácidos palmítico, linoléico e linolênico, porém não apresentou atividade, o que pode ser devido a quantidade de ácidos graxos, que através da curva de calibração pudemos constatar que é

significativamente inferior a quantidade de ácidos graxos presentes na sub-fração HXDL₅₀ de MA. Este é o primeiro estudo constatando a presença destes ácidos nas espécies vegetais *M. adansonii* e *M. deliciosa*, bem como a correlação dos aspectos quantitativos destes com a atividade antibacteriana.

4.4.6. Análise Química das Sub-frações do Extrato Diclorometano de *Monstera adansonii*.

A análise do perfil de fragmentação por CG-EM dos picos referentes às frações HX₁₀₀, HXDL₅₀, DL₁₀₀, DLAC₅₀, AC₁₀₀, ACME₅₀, ME₁₀₀, permitiu a caracterização de algumas substâncias (Tabela 16), com tempos de retenção que variaram entre 8,93 a 20,72 minutos, a saber:

- A sub- fração HX₁₀₀ apresentou um cromatograma reunindo o éter trimetilsilil do glicerol- Tempo de retenção: 8,92 min. Perfil de fragmentação (*m/z*): 293, 218, 205, 147, 117, 73; Éster etílico do ácido hexadecanóico (ÁCIDO PALMÍTICO) – Tempo de retenção: 18,00 min. Perfil de fragmentação (*m/z*): 241, 213, 185, 157, 101, 88 e 2-O-glicerol- alfa-d- galatopiranosídeo- Tempo de retenção: 20,71 min. Perfil de fragmentação (*m/z*): 337, 224, 217, 204, 147, 75, 73.
- A Sub- fração HXDL₅₀ apresentou um cromatograma com um éter trimetilsilil do glicerol, tempo de retenção 8,93 min. Perfil de fragmentação (*m/z*): 293, 218, 205, 147, 117,73, Éster etílico do ácido hexadecanóico (ÁCIDO PALMÍTICO) – Tempo de retenção: 18,00 min.
- A Sub- fração DL₁₀₀ apresentou um cromatograma com um éter trimetilsilil de glicerol- Tempo de retenção: 8,93 min. Perfil de fragmentação (*m/z*): 293, 218, 205, 147, 117,73.

- A Sub- fração DLAC₅₀, AC₁₀₀, ACME₅₀ apresentou um cromatograma com o éster etílico do ácido hexadecanóico (ÁCIDO PALMÍTICO) – Tempo de retenção: 18,00 min. Perfil de fragmentação (*m/z*): 241, 213, 185, 157, 101, 88.
- A Sub- fração ME₁₀₀ apresentou um cromatograma com o éter trimetilsilil do glicerol, tempo de retenção 8,92 min. Perfil de fragmentação (*m/z*): 293, 218, 205, 147, 117,73.

Tabela 16. Análise química das sub-frações do extrato diclorometano de *Monstera adansonii*.

Sub-frações	Substâncias	Tempo de Retenção
HX ₁₀₀	Éter trimetil-silil de glicerol	8,92 min
	Éster trimetil-silil do ácido hexadecanóico	18,01 min
	2-O-Glicerol- alfa-d-galatopiranosídeo	20,72 min
HXDL ₅₀	Éter trimetil-silil de glicerol	8,93 min
	Éster trimetil-silil do ácido hexadecanóico	18,01 min
DL ₁₀₀	Éter trimetilsilil de glicerol	8,93 min
DLAC ₅₀ , AC ₁₀₀ , ACME ₅₀	Éster trimetil-silil do ácido hexadecanóico	8,01 min
ME ₁₀₀	Éter trimetilsilil de glicerol	8,93 min

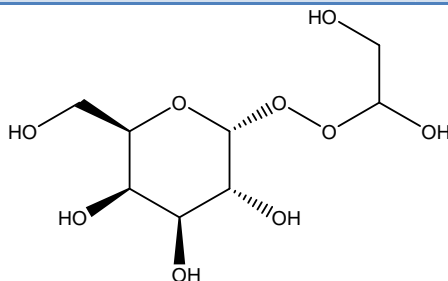


Figura 27. Estrutura química sugerida: 2 -O-Glicerol- alfa-D- glicopiranosídeo.

A fração HXDL₅₀ do extrato DCL (MA) apresentou o melhor resultado antibacteriano (Tabela 20) tendo atividade possivelmente relacionada a presença do ácido palmítico. É importante salientar que já existem descritos na literatura estudos a cerca da atividade antibacteriana do ácido palmítico, sendo o mesmo evidenciado como o constituinte químico majoritário em uma mistura ativa de ácidos graxos em *Diplotaxis harra* e *Eriçaria microcarpa* (HASHEM & SALEH, 1999). Esses autores constataram uma atividade antibacteriana, in vitro, do ácido frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas comparável a da ampicilina. Foi ainda conferida ao ácido palmítico a atividade antibacteriana observada no extrato em acetato de etila das raízes de *Pentanisia prunelloides*, com CMI de 780µg/mL frente a cepas ATCC de *S. aureus*, *E. coli* e *B. subtilis* (YFF et al., 2002).

4.5. Análise Química das Sub-frações do Extrato em Acetato de Etila de *Monstera adansonii* por Cromatografia por CLAE

As sub-frações obtidas por SPE foram submetidas a uma análise por CCF tendo sido utilizado como reagente cromogênico o revelador NP-PEG (específico para a classe dos flavonóides). As sub-frações com melhores resoluções cromatográficas (1, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 21,23, 29), foram selecionadas para posterior análise por CLAE através do método gradiente descrito na tabela 4. Dentre as sub-frações avaliadas, a análise da sub- fração 11 indicou a presença de picos referentes a presença de flavonóides com tempos de retenção que variam entre 14,8 e 16,9 minutos conforme figura 28. Os espectros de UV dos picos majoritários observados encontram-se nas figuras 29, 30, 31 e 32.

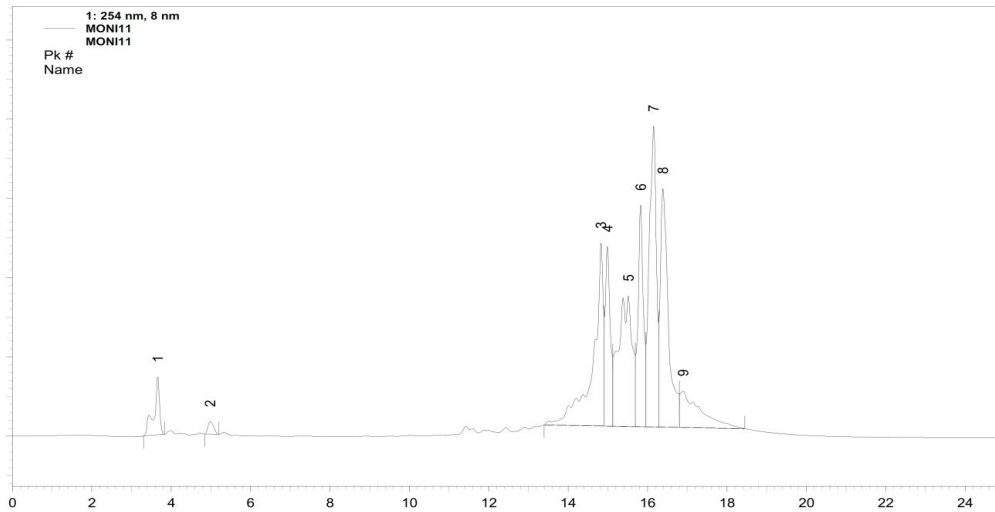


Figura 28. Cromatograma referente aos sinais com TR que variam de 4,8 a 16,9 minutos (flavonóides) obtido a partir da análise da fração 11 por CLAE-DAD.

Tabela 17: Tempo de retenção e espectro de UV dos flavonóides presentes na sub-fração 11.

Picos	Tempo de retenção (min)	Espectro de UV (nm)
3	14,8	205, 270, 334
4	14,9	202, 271, 337
5	15,3	204, 272, 337
6	15,5	202, 269, 336
7	15,8	203, 269, 334
8	16,0	207, 271, 332
9	16,3	203, 242, 334

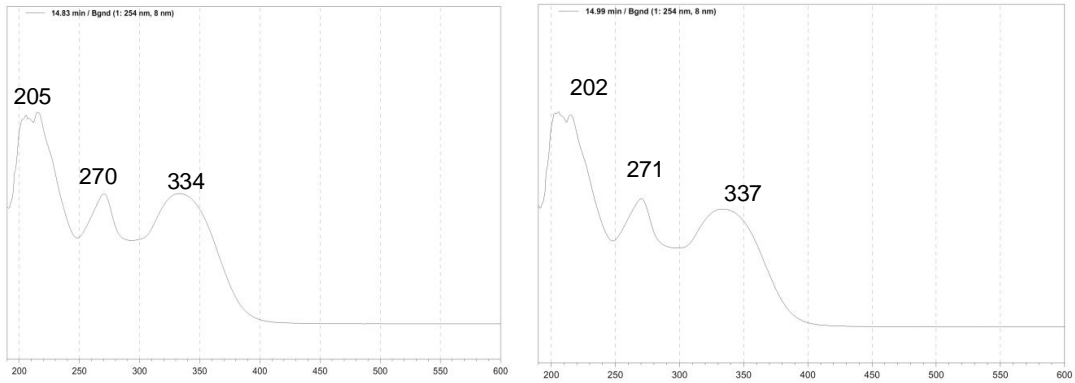
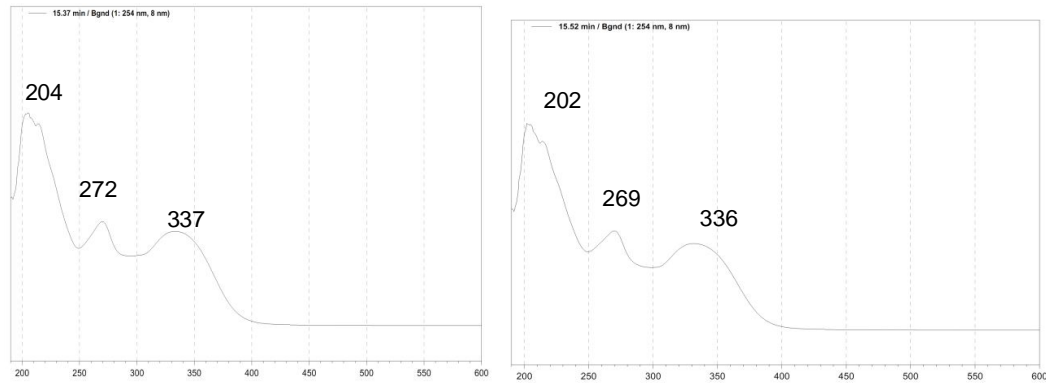


Figura 29. Espectro de UV referentes aos picos 3 e 4 com TR de 14,8 e 14,9 min respectivamente (flavonóides), obtidos a partir da análise da sub-fração 11.



Figuras 30. Espectro de UV referentes aos picos 5 e 6 com TR de 15,3 e 15,5 min respectivamente (flavonóides), obtidos a partir da análise da sub-fração 11.

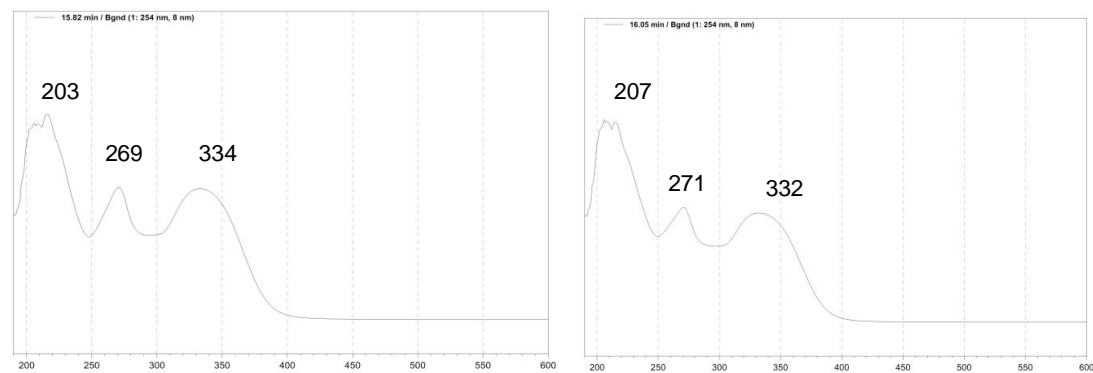


Figura 31. Espectro de UV referentes aos picos 7 e 8 com TR de 15,8 e 16,0 min respectivamente (flavonóides), obtidos a partir da análise da sub-fração 11.

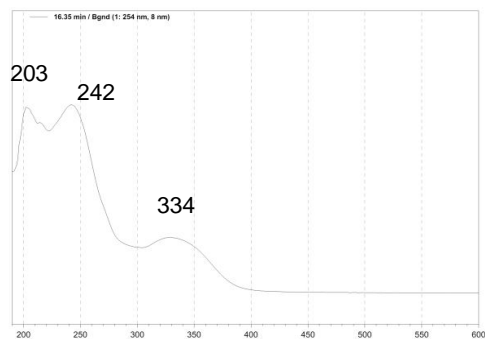


Figura 32. Espectro de UV referente ao pico 9 com TR de 16,3 min (flavonóide), obtido a partir da análise da sub-fração 11.

Dados da literatura mostram que espectros de UV com as absorvâncias apresentadas na tabela 17 indicam que os flavonóides presentes na sub-fração 11 pertencem à classe das flavonas (Figura 33) (RIJKE, et al. 2006). Dandan e colaboradores (2007) identificaram flavonas em *Pericarpium citri* e *Reticulatae viride* através da identificação dos respectivos espectros de UV, corroborando os resultados apresentados. Os espectros de UV identificados no presente trabalho em comparação com dados da literatura estão descritos na tabela 18.

Tabela 18. Relação de referências descrevendo espectro de UV de flavonas.

Referências	Espectro de UV (nm)
Presente estudo	204, 272, 337
DANDAN et al., 2007	203, 273, 338
RIJKE et al., 2006	204, 272,337
BOUÉ et al., 2003	204, 267, 336
ROY & CHATTERJEE, 2010	204, 275, 335

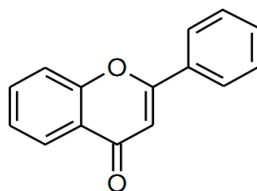


Figura 33. Estrutura básica do esqueleto flavona.

Vale ressaltar que este é o primeiro estudo descrevendo a presença de flavonóides e, especificamente, esqueletos do tipo flavonas em extratos da espécie vegetal *M. deliciosa*, sendo esta investigação de grande contribuição.

4.6. Atividade Antibacteriana de Extratos de *Monstera adansonii* e *M. deliciosa*.

A partir do rastreamento da atividade antibacteriana dos seguintes extratos: bruto (BR), hexânico (HX), diclorometânico (DL), acetato de etila (AC), butanólico (BU) e aquoso (AQ) de *Monstera deliciosa* Liebm. e *Monstera adansonii* Schott. resultados promissores puderam ser observados. Dentre estes, o extrato que apresentou atividade importante frente às bactérias da tabela 7 foi o extrato hexânico de *Monstera adansonii* Schott. Na concentração de 256 µg/mL, este extrato inibiu 92% do total das amostras testadas, não sendo inibidas apenas 2 amostras: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *S. haemolyticus* (ATCC 29970). Na concentração de 512 µg/mL, o extrato HX inibiu 96% deste total (Tabela 7), não inibindo apenas a amostra de *Escherichia coli* (ATCC 25922). Diante dos resultados alcançados observou-se que foram inibidas não só amostras clínicas e padrão de *Staphylococcus aureus*, mas também amostras padrão de *S. epidermidis* (ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *S. hominis* (ATCC 27844). Os demais extratos vegetais não demonstraram qualquer efeito significativo sobre o crescimento bacteriano quando avaliados nas concentrações testadas.

Diante deste resultado, realizou-se um novo ensaio para avaliação da atividade dos extratos de *M. adansonii*, entretanto, frente a amostras clínicas de *Acinetobacter baumannii* (Tabela 9), além da amostra padrão ATCC 48695 (*Acinetobacter baumannii*). O EB foi o que apresentou atividade mais significativa, pois, na concentração de 1024µg/mL, inibiu 80% das bactérias testadas, não inibindo apenas 55AB e 64AB (amostras de sítio sanguíneo). Na concentração de 512 µg/mL o EB inibiu 10% (ATCC 48695) e (OXA 27) do total das amostras testadas (Tabela 9). Na concentração de 1024 µg/mL os extratos HX e DL apresentaram importante atividade, pois inibiram 75% das amostras, enquanto que na concentração de 512 µg/mL estes apresentaram atividade frente a 10 e 20% das amostras, respectivamente. Os extratos ACET, BU e AQ, apresentaram atividade frente a 5% (1024 µg/mL) das amostras testadas, inibindo apenas a amostra padrão ATCC 48695, o que pode estar relacionado ao fato desta amostra, apresentar-se sensível ao Imipenen. Nas demais concentrações não houve nenhum resultado significativo (tabela 19). Já existem estudos descritos na literatura a cerca de atividade antimicrobiana de plantas frente a bactérias gram-negativas. ZAMPINI, *et al.*; 2005 relata a atividade antimicrobiana de uma sub-fração proveniente do extrato etanólico de *Zuccagnia punctata*. frente a *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella morgani*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*. com MICs que variaram entre 0,10 e 1,00µg/mL. As folhas e a raiz de *Toddalia asiatica* apresentaram atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (MIC 62,5µ g / mL), *Enterococcus faecalis* (MIC 31,25 µg / mL), *Pseudomonas aeruginosa* (MIC 250 µg / mL), *Acinetobacter baumannii* (MIC 125 µg/mL) (DURAI PANDIYAN & IGNACIMUTHU, 2009). Vale ressaltar, que este é o primeiro estudo de atividade

antibacteriana das partes aéreas de *M. adansonii*. sendo esta investigação de grande contribuição para produção de futuros fitofármacos provenientes desta espécie.

Tabela 19. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de MA frente ao total de amostras clínicas e padrão de *Acinetobacter baumannii*.

Extratos	1024 µg/mL	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL
Bruto	80%	10%	-	-
Hexano	75%	10%	-	-
Diclorometano	75%	20%	-	-
Acetato de etila	5%	-	-	-
Butanol	5%	-	-	-
Aquoso	5%	-	-	-

(-) Ausência de efeito inibitório.

4.7. Avaliação da Atividade Antibacteriana das Sub-frações Provenientes dos Extratos Hexânico e Diclorometânico de *Monstera adansonii*.

As sub-frações previamente descritas, obtidas a partir da filtração à vácuo do extrato hexânico e diclorometano (Tabelas 1, 2 e 3), foram testadas através do método de diluição em ágar Müeller-Hinton (item 4.4) para avaliação do potencial antibacteriano nas concentrações de 1024 µg/mL, 512 µg/mL e 256 µg/mL. Esta avaliação foi realizada frente às mesmas amostras bacterianas utilizadas nos ensaios anteriores com os extratos vegetais (Tabela 7). Dentre as sub-frações avaliadas a fração HXDL₅₀ apresentou atividade frente a 48% do total de amostras bacterianas investigadas, apresentando uma CMI de 1024 µg/mL. Dentre as amostras inibidas encontram-se 8 amostras clínicas (517, 520, 526, 527, 529, 551,

633, 646) isoladas de diferentes sítios de infecção hospitalar bem como as amostras padrão (ATCC 29213 e 33591) de *S. aureus*, Além disso, foram inibidas amostras padrão de *S. haemolyticus* (ATCC 29970) e *S. hominis* (ATCC 27844). As outras frações não demonstraram efeito significativo sobre o crescimento bacteriano.

Considerando o menor rendimento das sub-frações obtidas da filtração à vácuo do DCL de *M. adansonii*, a avaliação da atividade antibacteriana foi realizada através do método de diluição em caldo (concentrações variando de 4096 a 256 µg/mL) frente a amostra ATCC 29213. Este método, além de determinar a CMI das sub-frações, também permite definir a CMB. Na concentração de 4096 µg/mL houve inibição bacteriana pelas sub-frações HX₁₀₀ e HXDL₅₀ provenientes do DCL, e da fração HXDL₅₀ do HX (MA). Já na concentração de 2048µg/mL houve inibição bacteriana apenas pela sub-fração HXDL₅₀ do HX (MA).

Espécies vegetais produzem uma ampla variedade de metabólitos secundários como taninos, terpenóides, alcalóides e flavonóides, que apresentam significantes propriedades antimicrobianas (HABBAL et al., 2011). Todos os extratos derivados das partes aéreas de MD e MA foram testados quanto ao seu potencial antibacteriano frente a várias cepas padrão e clínicas de diferentes espécies bacterianas. Porém o extrato que se destacou por apresentar excelente atividade foi o extrato hexânico de MA. Um estudo realizado por Castilho e colaboradores (2012) descreve a importante atividade antimicrobiana do extrato hexânico proveniente de *Origanum vulgare*, frente a vários tipos de bactérias como, *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* e *Candida albicans*. Weerakkody et al. (2010) destacam o extrato hexânico (*Alpinia galanga*) como o mais ativo contra *E. coli*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* em relação aos outros extratos testados. Além do extrato hexânico, todos os extratos de

MA foram ativos frente a amostras padrão e clínicas de *Acinetobacter baumannii* apresentando uma CMI de 1024 µg/mL. Garvey et al. (2011) relatam o fato de extratos vegetais possuírem menor atividade contra amostras bacterianas Gram-negativas, o que corrobora o nosso estudo. Isto acontece, possivelmente, devido a composição da membrana externa presente em bactérias gram-negativas ser composta principalmente por moléculas de lipopolissacarídeos, o que forma uma barreira de permeabilidade hidrofílica, constituindo uma proteção contra os efeitos de substâncias altamente hidrofóbicas (DE LÉON et al., 2010).

4.7.1. Determinação da CMB Frente a *S. aureus* (ATCC 29213).

No estudo da avaliação da concentração mínima bactericida foram contabilizadas na placa controle 563 colônias, valor este que foi multiplicado por 5000 (nº de diluições), atingindo o valor final de 2.815.000 (que corresponde ao inóculo inicial). Este inóculo inicial foi multiplicado por 0,1mL (alíquota) e o valor obtido multiplicado por 0,001 (taxa de micro-organismos viáveis), obtendo como valor final 281 colônias, que corresponde a 0,01% de células viáveis. Portanto, para ser considerado bactericida, o total de colônias verificado nas placas deve corresponder a um valor inferior a 281 colônias.

A partir das diluições com as sub-frações que promoveram inibição do crescimento bacteriano (Tabela 20) foram retiradas alíquotas e semeadas em placas de Petri, sendo estas incubadas por 24h. Após este período verificou-se que o crescimento bacteriano foi completamente inibido (0 colônia), sendo este valor inferior ao número de células viáveis (281). Desta forma, as frações de MA HX₁₀₀ e HXDL₅₀ do EDL, e HXDL₅₀ do EHX foram consideradas bactericidas.

Tabela 20. Avaliação da atividade antibacteriana das sub-frações obtidas da filtração à vácuo do extrato diclorometânico de *Monstera adansonii* Schott.

Código das sub-frações	4096 µg/mL	2048 µg/mL	1024 µg/mL	512 µg/mL	256 µg/mL
HX₁₀₀	I	C	C	C	C
HXDL₅₀	I	I	C	C	C
DL₁₀₀	C	C	C	C	C
DLAC₅₀	C	C	C	C	C
AC₁₀₀	C	C	C	C	C
ACME₅₀	C	C	C	C	C
ME₁₀₀	C	C	C	C	C
HXDL₅₀ de HX	I	I	C	C	C

(C) Crescimento

(I) Inibição

Bergsson et al. (2002) relatam que ácidos graxos de cadeia média e longa, possuem efeito bactericida já descrito há décadas. O extrato hexânico e as sub-frações ativas, provenientes dos extratos hexânico e diclorometano (MA) demonstraram efeito bactericida, uma vez que inibiram 99,9% do crescimento bacteriano. Estes resultados são bastante importantes e promissores, uma vez que grande parte dos antibióticos disponíveis possui ação bacteriostática. Com isso, destaca-se a grande importância pela busca de novas substâncias com ação bactericida, o que pode contribuir para redução do surgimento de cepas multiresistentes (GOLD & PILLAI, 2009).

4.8. Avaliação da Curva de Crescimento e de Morte de *S.aureus* ATCC 29213 na Presença da Sub-fração Obtida do Extrato Hexânico de *M. adansonii*.

Os ensaios de crescimento e morte bacteriana foram realizados com a amostra de *S.aureus* ATCC 29213 (MSSA), na presença da sub-fração ativa HXDL₅₀ obtida do extrato hexânico de *M. Adansonii*. Na curva de crescimento bacteriana, a sub-fração foi adicionada em concentrações de 2048, 1024, 512 e 256 µg/mL.

A leitura teve início no tempo zero sendo esta feita até 8h, a cada 1h. No tubo controle observou-se crescimento significativo durante todo o período de incubação, havendo apenas alguns períodos de pouco crescimento ou crescimento não significativo (1-2h; 4-6h). Ao se analisar a curva na presença das sub-frações nas diferentes concentrações, observou-se que houve aumento no crescimento bacteriano entre 0-1h, sendo verificada estabilidade no crescimento entre 1- 4h. Um crescimento importante foi observado entre 4-8h à 256 µg/mL de HXDL₅₀, entretanto, neste mesmo intervalo, observou-se claramente que nas concentrações de 1024 e 2048 µg/mL este crescimento apresentou-se pouco pronunciado (Figura 34).

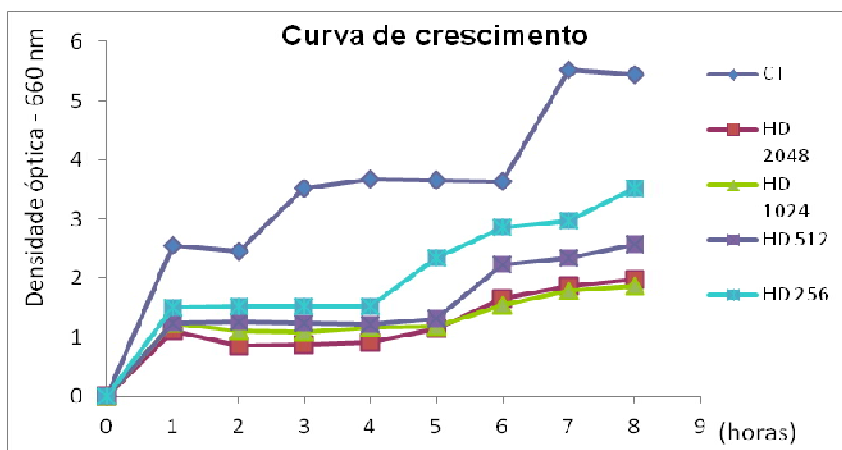


Figura 34. Curva de crescimento bacteriano na presença da fração HXDL₅₀

A curva de morte foi também avaliada, tendo esta etapa o objetivo de acompanhar, através de uma análise de contagem de células, a regressão no crescimento bacteriano na presença da sub-fração ativa. Para esta avaliação, a sub-fração foi adicionada em uma concentração correspondente à 2x a CMI. A curva de morte teve início no tempo 0 de incubação sendo avaliados os tempos 1, 2, 4 e 24h. Na presença de HXDL₅₀, houve uma redução pouco significativa no crescimento nas primeiras 4h de tratamento, sendo evidenciado efeito inibitório total após 24h de tratamento (Figura 35).

Estes resultados estão de acordo com a CMI previamente estabelecida de 2048 µg/mL (Tabela 18) e confirmam a ação bactericida da sub-fração ativa HXDL₅₀, já que nas concentrações de 1024 e 2048 µg/mL (MIC estabelecido) o crescimento bacteriano apresentou-se pouco pronunciado e após 24 horas houve a inibição total.

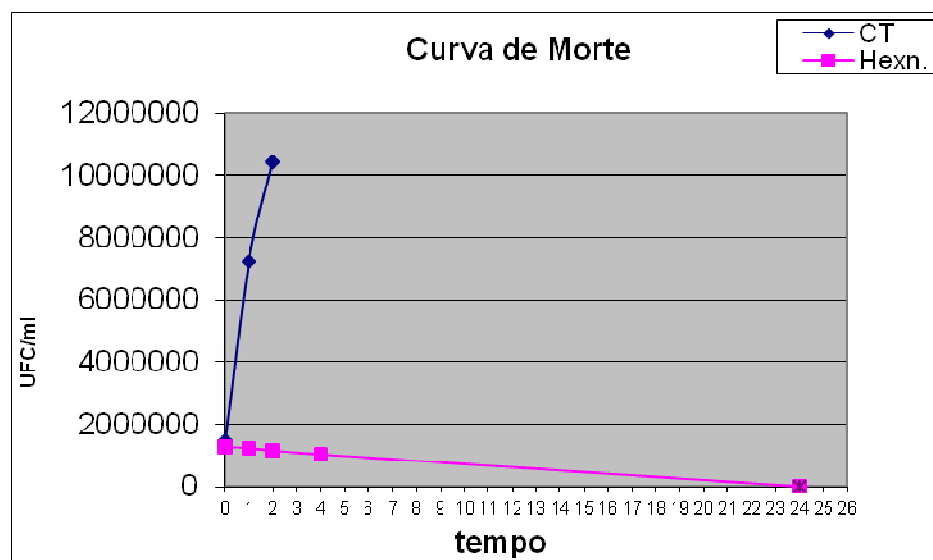


Figura 35. Curva de morte bacteriana na presença da fração HxDL₅₀

4.9. Avaliação da Capacidade Antioxidante pelo Método DPPH.

Sendo o DPPH reconhecido como um dos métodos mais utilizados para mensurar o teor de atividade antioxidante de produtos naturais, este foi um dos métodos utilizados para testar todos os extratos de MD e MA (Figura 11).

Através da tabela 21 podemos observar que os extratos obtidos de MD e MA não se apresentaram muito ativos pelo método do DPPH. O extrato mais ativo foi o extrato em acetato de etila de MD que apresentou um valor de CE_{50} igual a 62,80 $\mu\text{g/mL}$, valor pouco menos expressivo do que o controle EGB 761, cujo CE_{50} é de 38,91 $\mu\text{g/mL}$. Os demais extratos não possuíram potencial antioxidante significativo. Esses resultados podem ser observados através da tabela 21 e figuras 36 e 37.

Tabela 21. Valores de CE_{50} dos extratos derivados de MD e MA referente à atividade antioxidante pelo método do DPPH.

Extratos vegetais	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
	MD	MA
HX	15994,49	15401,8
DCL	311,06	252,58
ACET	62,80	146,15
BU	212,72	5597,07
AQ	215,95	$3,72 \times 10^{13}$
BR	28346,09	252,71
<i>EGB761</i>	38,91	-

Na tabela 22 é possível observar o percentual médio das atividades antioxidantes (AAO%) dos extratos de MD. Os valores mostram que à 250 $\mu\text{g/mL}$, o extrato em ACET apresentou expressiva atividade antioxidante, sendo esta próxima a 90%, seguido do extrato DCL (58%) e BU (56%).

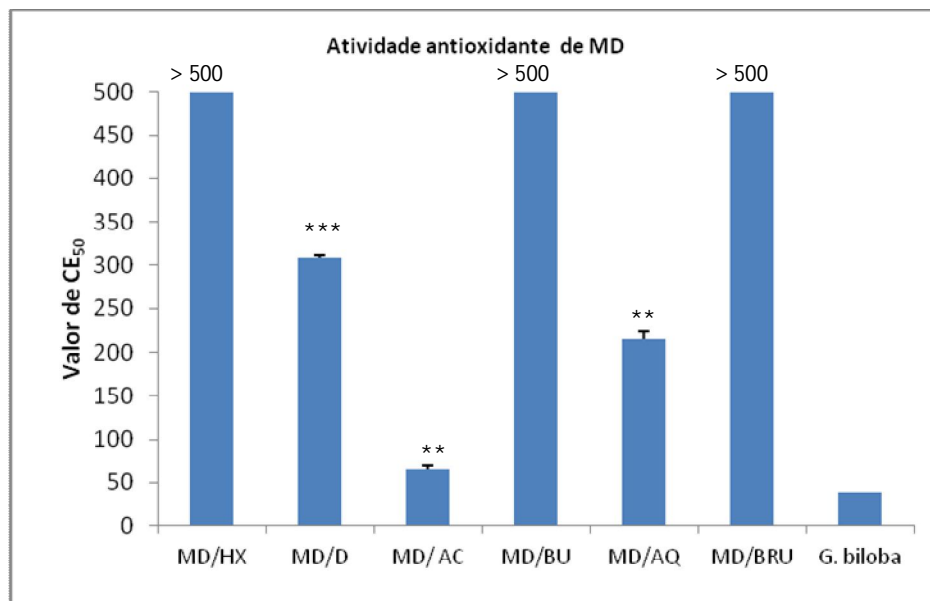


Figura 36. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos obtidos de MD pelo método do DPPH. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes, com triplicata * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (teste t de Student) comparados ao controle EGB 761 de *G. biloba*.

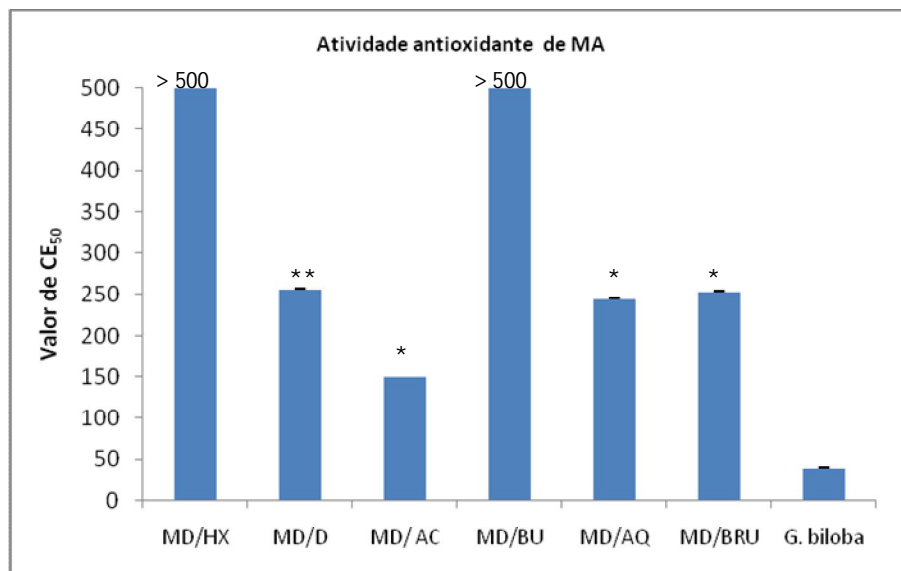


Figura 37. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos obtidos de MA pelo método do DPPH. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes, com triplicata * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (teste t de Student) comparados ao controle EGB 761 de *G. biloba*.

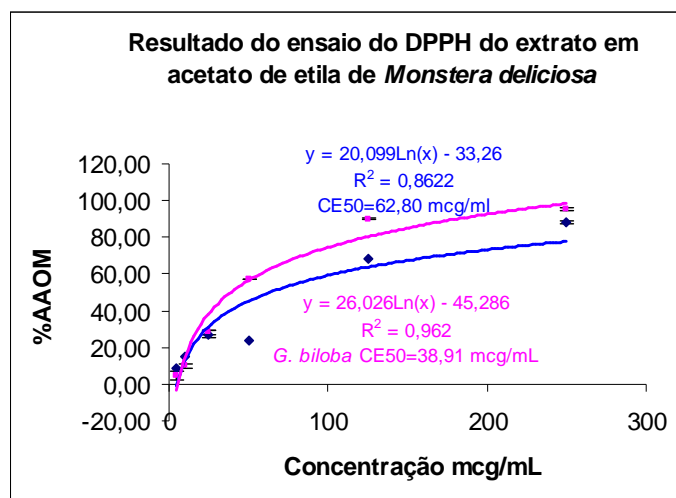


Figura 38. Avaliação do potencial antioxidante do extrato em acetato de etila de MD pelo método DPPH.

Tabela 22. Percentual médio das atividades antioxidantes (AAO%) dos extratos de MD, comparando com o padrão positivo *Ginkgo biloba* EGb 761®. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes, com triplicata.

Amostras	AAO% em 250 μ g/mL	AAO% em 125 μ g/mL	AAO% em 50 μ g/mL	AAO% em 25 μ g/mL	AAO% em 10 μ g/mL	AAO% em 5 μ g/mL	CE ₅₀ (μ g/mL)
Extrato bruto	20,90 \pm 0,35	12,94 \pm 0,37	6,98 \pm 0,25	5,96 \pm 0,45	5,65 \pm 2,4	4,84 \pm 0,47	28346,09
Extrato hexânico	28,98 \pm 0,48	14,86 \pm 0,32	5,01 \pm 0,21	3,57 \pm 0,29	4,18 \pm 0,25	1,70 \pm 0,21	15994,49
Extrato diclorometânico	57,95 \pm 0,19	35,21 \pm 0,09	14,68 \pm 0,04	6,93 \pm 0,08	5,23 \pm 0,05	1,31 \pm 0,18	311,06
Extrato em acetato de etila	88,28 \pm 0,68	68,32 \pm 0,39	23,53 \pm 0,38	21,12 \pm 0,13	14,86 \pm 0,33	8,28 \pm 0,23	62,80
Extrato butanólico	56,86 \pm 0,45	42,09 \pm 0,32	26,75 \pm 0,61	12,81 \pm 0,38	6,49 \pm 0,25	2,09 \pm 0,17	212,72
Extrato aquoso	33,12 \pm 0,22	32,68 \pm 0,35	31,55 \pm 0,47	4,05 \pm 0,25	8,63 \pm 0,51	0,70 \pm 1,11	215,95
<i>EGb 761</i> ®	96,48 \pm 0,06	92,25 \pm 0,08	67,45 \pm 0,15	38,14 \pm 0,07	25,03 \pm 0,05	12,32 \pm 0,09	38,91

A formação de radicais livres ocorre como consequência natural do metabolismo celular. Porém é sabido que o estresse oxidativo, caracterizado por uma intensa sobrecarga de espécies reativas de oxigênio, pode ser extremamente lesivo às estruturas celulares. Neste estudo, observou-se que a atividade antioxidante que se mostrou mais significativa foi o extrato em acetato de etila de MD (CE₅₀ 62,80µg/mL), no qual foram identificados flavonóides como constituintes químicos majoritários. Os flavonóides são substâncias naturalmente presentes nas plantas e exibem importantes efeitos benéficos sobre a saúde humana como os efeitos anti-isquêmico, antiagregantes plaquetários, anti-inflamatórios, o que torna esses polifenóis particularmente úteis na prevenção de patologias humanas em que produção de radicais livres desempenha um papel fundamental, como aterosclerose, lesão isquêmica, envelhecimento, doenças neurológicas degenerativas (Parkinson e Alzheimer), inflamação e câncer (SAKANO et al., 2005). Estas atividades biológicas estão muitas vezes relacionadas aos seus efeitos antioxidantes que podem agir por vários mecanismos como, por exemplo, inibindo a peroxidação lipídica, através de ligações de íons metálicos e, com isso, interferindo nos sistemas enzimáticos responsáveis pela geração de radicais livres (SGHAIER et al., 2011).

4.10. Avaliação da Capacidade Antioxidante pelo Método ORAC

Outro método utilizado para testar a atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir de MD e MA foi o método ORAC. Este teste, conhecido por avaliar a capacidade antioxidante total, tem sido aplicado com sucesso em amostras de natureza complexa, além daquelas provenientes de indústrias de alimentos, bebidas cosméticos e nutracêuticos. A capacidade antioxidante é relatada por comparação com um padrão que é um antioxidante solúvel em água conhecido comercialmente

como Trolox (STOCKHAMA et al., 2011). Todos os extratos de MD e MA foram testados quanto à capacidade antioxidante pelo método ORAC, portanto, apenas os extratos ACET, BU e AQ de MD apresentaram importante atividade em todas as concentrações testadas quando comparados ao Trolox. O extrato AQ se destacou por apresentar atividade antioxidante superior ao Trolox em todas as concentrações testadas, conforme se observa na figura 39. O extrato em ACET (Figura 40) também apresentou importante atividade antioxidante, uma vez que, na menor concentração avaliada (5 µg/mL), esta fração apresentou valores de fluorescência próximos a 1,0. Na concentração de 10 µg/mL, os valores de fluorescência emitidos foram equivalentes aqueles exibidos pelo TROLOX à 5 µg/mL. É importante salientar que a fração ACET também exibiu atividade significativa pelo método do DPPH como descrito anteriormente (item 5.9).

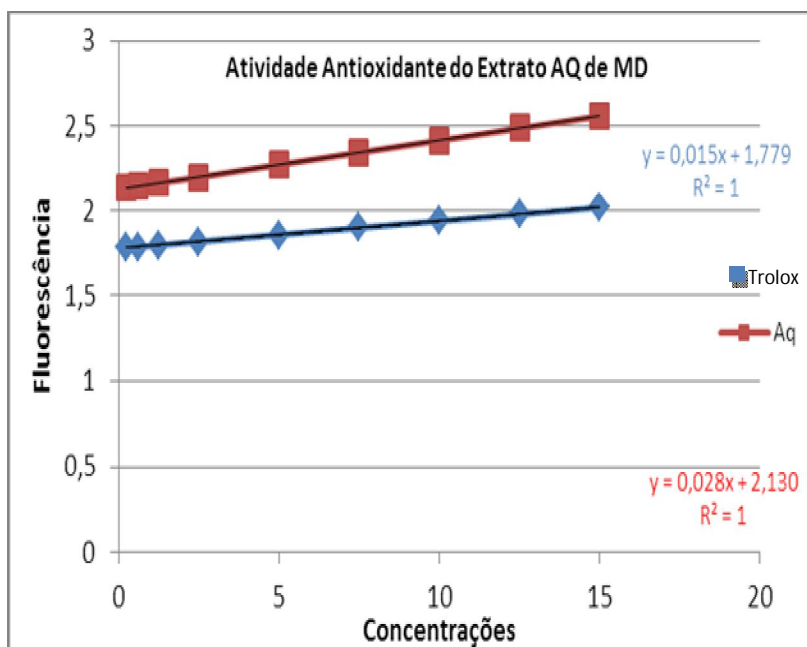


Figura 39. Avaliação do potencial antioxidante do extrato aquoso de MD pelo método ORAC.

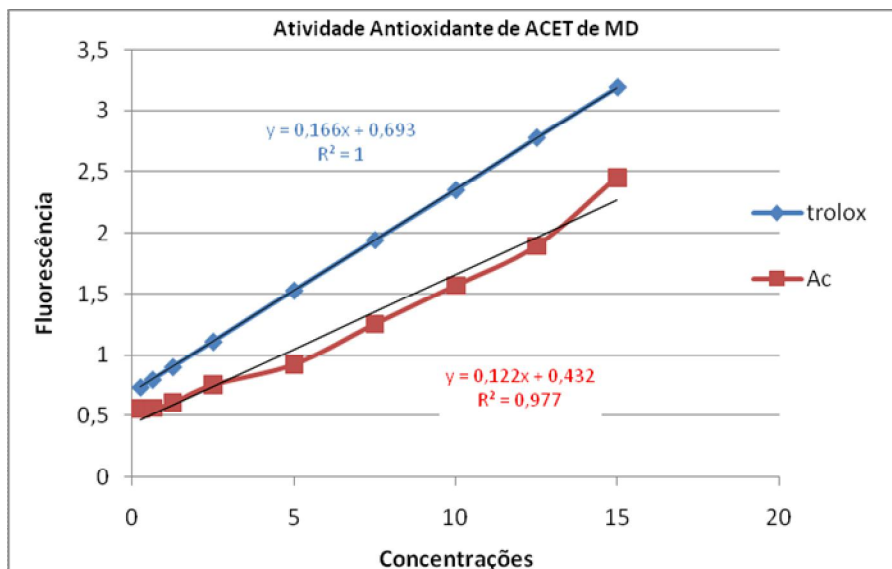


Figura 40. Avaliação do potencial antioxidante do extrato em acetato de etila de MD pelo método ORAC.

O extrato BU também apresentou atividade antioxidante bastante significativa, tendo apresentado valores de emissão de fluorescência próximos ao TROLOX, especialmente na maior concentração avaliada (15 µg/mL) (Figura 41). Os demais extratos de MD e MA não apresentaram atividade através do método ORAC, conforme pode ser constatado nos gráficos dos anexos 1 e 2 .

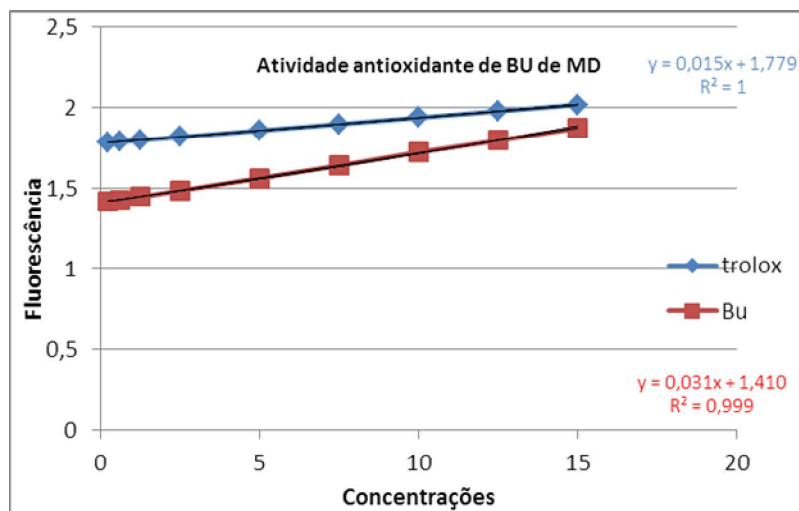


Figura 41. Avaliação do potencial antioxidante do extrato butanólico de MD pelo método ORAC.

É sugerido que a atividade antioxidante verificada para o extrato em ACET seja exibida devido a presença de flavonoides do tipo flavonas identificados pelos espectros de UV característicos. A literatura científica, de acordo com Liu et al. (2011) aponta dados bastante correlatos, pois descreve as flavonas como os constituintes responsáveis pela atividade antioxidante da seda do milho. Zielinska & Zielinski (2011) relataram que a flavona luteolina-6-C-glicosídeo mostrou alta capacidade antioxidante pelo método ABTS e DPPH. Além disso, em estudos atuais com diferentes flavonas glicosiladas, estas foram identificadas como as responsáveis pela atividade antioxidante observada em extratos de espécies do gênero *Asystasia* pelo método DPPH e ORAC (WORAWITTAYANON et al., 2012).

4.11. Avaliação da Capacidade Quelante do Íon Ferroso.

Algumas espécies vegetais produzem substâncias com grande capacidade de remover metais do meio, promovendo a morte de micro-organismos. Além disso, protegem contra os efeitos oxidativos através da reação de Fenton (SUGANTHY et al.; 2010). A ferrozina é responsável por tornar a solução rósea de acordo com a quantidade de ferro disponível. Assim, quanto menos íons são quelados pelo constituinte investigado, maior o número de íons disponíveis para reação com a ferrozina e, maior será a absorvância (Dos Santos et al., 2010).

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que o extrato em acetato de etila de MD e os extratos hexânico e diclorometano de MA apresentaram significativa capacidade quelante do íon ferroso em todas as concentrações testadas em comparação ao controle (quercetina). Os demais extratos: bruto (MD e MA), hexânico (MD), diclorometânico (MD), acetato de etila (MA) e aquoso (MD e MA) não apresentaram resultado significativo como mostram as figuras 42 e 43.

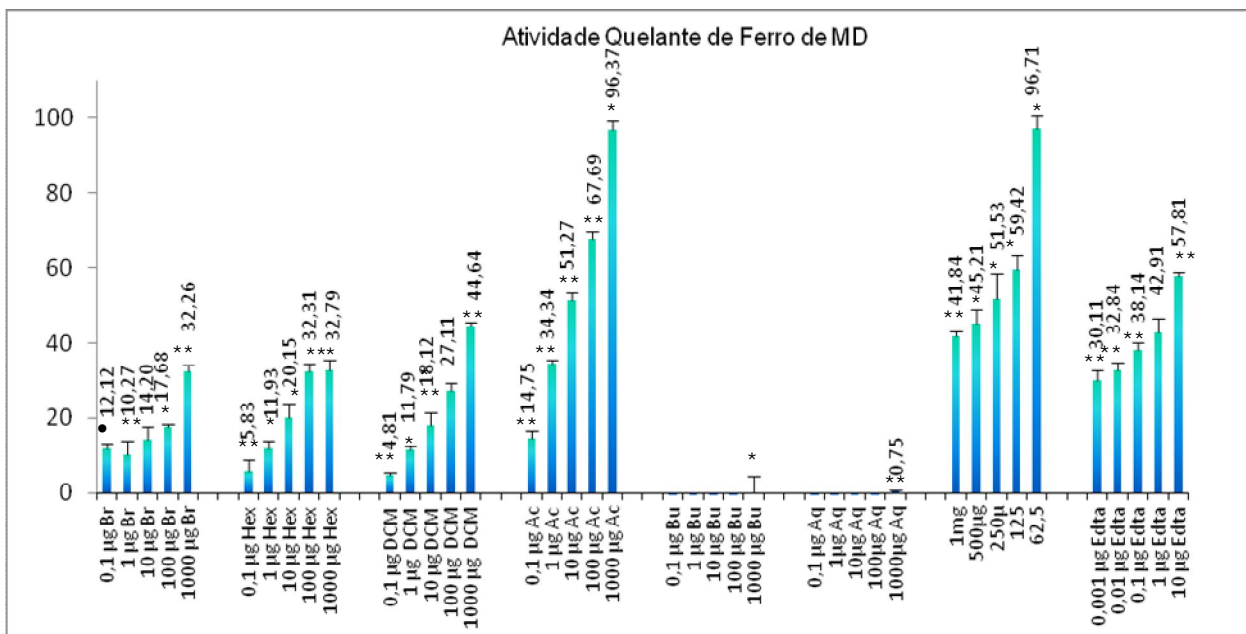


Figura 42. Capacidade quelante de íons ferrosos (%) dos extratos MD, em comparação com os padrões quercetina e EDTA-Na₂. Os resultados representam a média ± desvio padrão do teste realizado em triplicata de 3 experimentos independentes, com triplicata * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (teste t de Student).

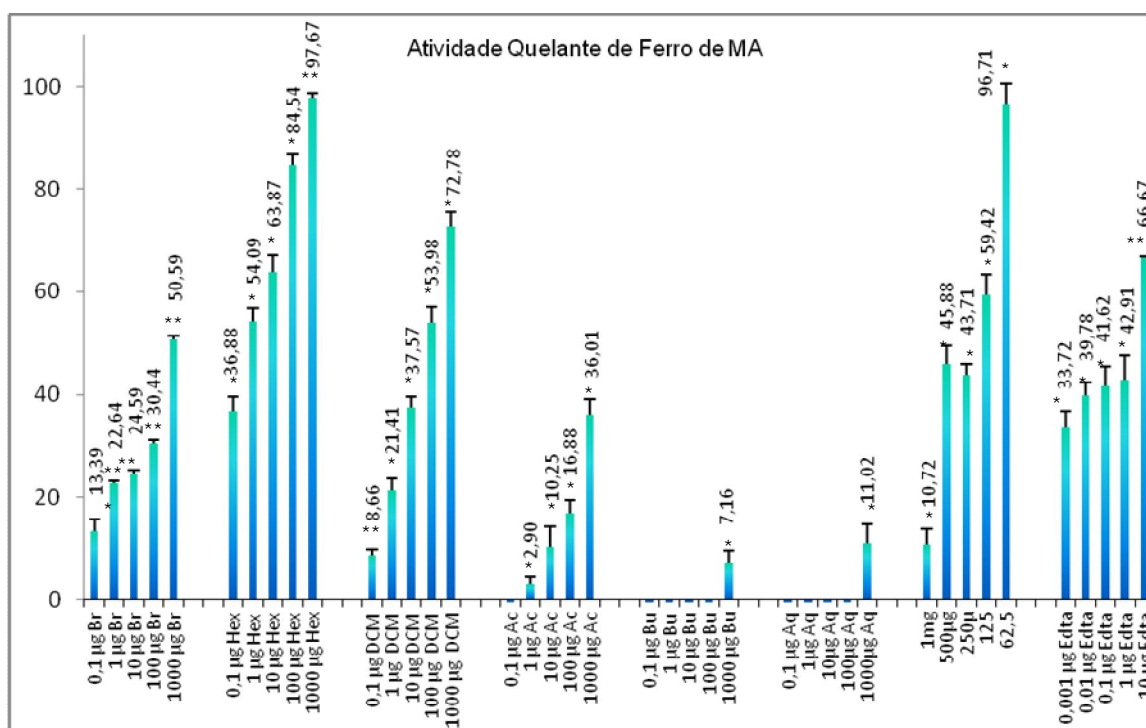


Figura 43. Capacidade quelante de íons ferrosos (%) dos extratos de MA, em comparação com os padrões quercetina e EDTA-Na₂. Os resultados representam a média ± desvio padrão do teste realizado em triplicata de 3 experimentos independentes, com triplicata * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (teste t de Student).

A atividade antibacteriana e antioxidante de várias substâncias podem estar relacionadas a sua propriedade quelante de ferro (Havsteen, 2002). Os extratos que apresentaram importante capacidade quelante de ferro em todas as concentrações foram os extratos acetato de etila de MD e o extrato hexânico de MA. O extrato ACET de MD apresentou capacidade quelante de 96,37% na concentração de 1000 µg/mL e 67,69% na concentração de 100 µg/mL. Este resultado é bastante significativo quando comparado à quercetina, que exibiu 96,71% (1000µg/mL) e 59,42% (100µg/mL) de atividade. O extrato HX de MA também apresentou importante atividade comparado ao padrão ativo de quercitina, seguido do DCL (MA), uma vez que mostrou 96,67% de atividade quelante à 1000µg/mL, 84,54% à 100µg/mL, 63,87% à 10µg/mL, 54,09% à 1µg/mL e 36,68% na menor concentração avaliada (0,1µg/mL).

Este resultado pode correlacionar a capacidade quelante à atividade antibacteriana observada para os extratos HX (MA) e DCL (MA) uma vez que a ausência do metal pode levar a morte dos micro-organismos. A literatura confirma satisfatoriamente a relação entre ácidos graxos e a sua importante capacidade quelante de ferro. A presença de ácidos graxos no óleo da espécie *Centaurea L.* apresentou importante capacidade quelante de ferro, utilizando EDTA como controle (AKTUMSEK et al., 2011) Substâncias quelantes de ferro podem também prevenir processos de estresse oxidativo e isto, pode estar relacionado a formação de complexos da amostra com Fe II, inibindo a reação de Fenton. Esta reação se caracteriza pela reação entre $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2 na presença de íons de metais de transição que gera radical OH^{\bullet} . O radical OH^{\bullet} pode reagir com um grande número de moléculas, incluindo proteínas, lipídios de membrana e DNA (MEDINA et al., 2002; TAGURI et al., 2004; LOPES, et al., 1999).

Diversos estudos já correlacionaram a capacidade quelante de extratos vegetais com esqueletos de flavonóides, corroborando o resultado positivo para o extrato ACET (MD). Em diferentes graus de pH, flavonas, flavonóis e flavanonas mostraram-se potentes quelantes comparados ao controle deferoxamina (MLADENKA et al.; 2011). Os flavonóides presentes nas folhas de *Diospyros kaki*, por exemplo, revelaram-se potentes quelantes de ferro em comparação com a rutina (padrão) (SUN et al., 2011).

4.12. Avaliação da Citotoxicidade In-vitro do Extrato Hexânico e da Sub-Fração Hexano/dicloro 50%

O teste de citotoxicidade foi realizado a fim de se avaliar a toxicidade do extrato hexânico de MA e da sub-fração HXDL₅₀ de MA. Neste experimento foram utilizadas células BCS-40 (epitélio de rim de macaco verde africano). As amostras foram testadas em concentrações de 2048, 1024, 512, 256, 128 e 64 µg/mL. De acordo com a figura 44, podemos observar que o extrato HX de MA apresentou-se altamente tóxico nas concentrações de 2048 e 1024 µg/mL, pois manteve apenas 20% de células vivas. Na concentração de 512 µg/mL cerca de 70% de células vivas foram preservadas mostrando uma toxicidade de apenas 30% em relação ao controle. Já nas concentrações de 256, 128 e 64 µg/mL não foi observada toxicidade comparada ao controle. Também podemos observar através da figura 44 que a sub-fração HXDL₅₀ de MA mostrou-se moderadamente tóxica nas concentrações de 2048 (50%) e 1024 (60%). Na concentração de 512 µg/mL a sub-fração HXDL₅₀ de MA apresentou uma baixa citotoxicidade pois manteve 90% das células vivas. As demais concentrações não se apresentaram citotóxicas mantendo 100% de células vivas como mostra a figura 44.

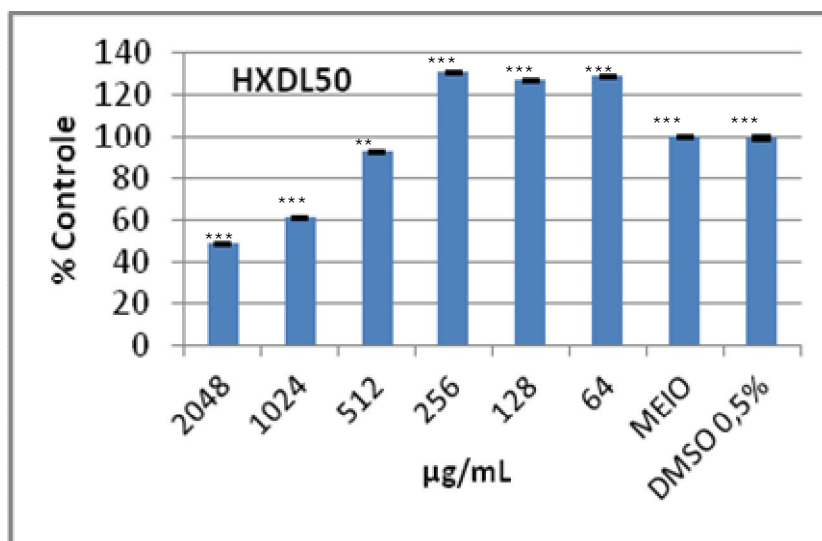
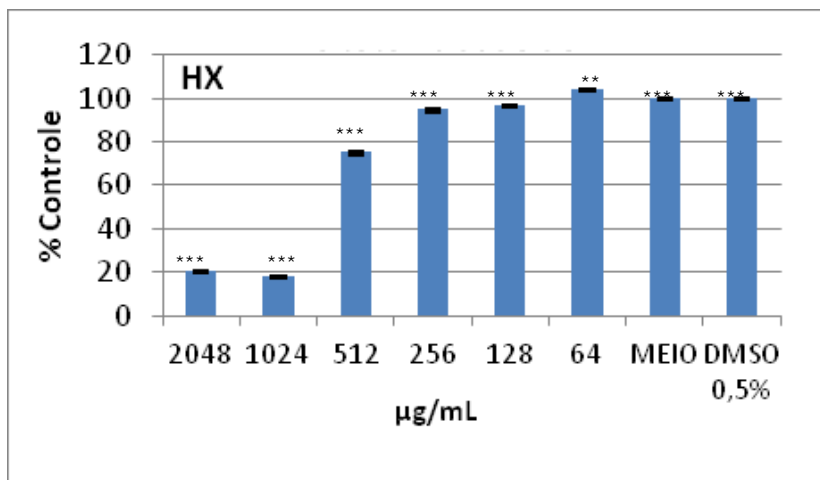


Figura 44. Avaliação do potencial citotóxico in-vitro do extrato HX e da sub-fração HXDL₅₀ utilizando células BCS-40 (epitélio de rim de macaco verde africano). Os resultados representam a média ± desvio padrão do teste realizado em triplicata de 3 experimentos independentes, com triplicata * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (teste t de Student).

O extrato hexânico mostrou-se citotóxico nas concentrações 2048 e 1024 µg/mL, porém na concentração de 512 µg/mL (MIC estabelecido) esta citotoxicidade foi de apenas 30%. O mesmo aconteceu para sub-fração HXDL₅₀ de MA que se mostrou citotóxica na maior concentração (2048 µg/mL) e na concentração de 1024 µg/mL (MIC estabelecido), tendo esta citotoxicidade se apresentado em torno de

40% em relação ao controle. ORHAN et al. (2009) correlacionam a presença de ácidos graxos e baixa citotoxicidade aos extratos hexânicos de várias espécies vegetais como *Anthemis tinctoria*, *Carduus acanthoides*, *C. nutans*, *Cirsium hypoleucum*, *Cynara scolymus* (Asteraceae), *Silene vulgaris* (Caryo-phyllaceae), *Ajuga chamaepitys ssp. chia var. ciliata* (Lamiaceae), e *Lappula barbata* (Boraginaceae). Já existem estudos sobre baixa citotoxicidade de ácidos graxos como o ácido hexadecanóico, ácido octadecanóico, 9-octadecenoico e 9,12-octadecadienóico presentes no extrato hexânico de *Typhonium flagelliforme* também pertencente a família Araceae (CHOO et al.; 2001).

4.13. Avaliação da Toxicidade Aguda do Extrato Hexânico de *M. Adansonii*

A avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de MA, utilizando camundongos, teve como objetivo analisar o comportamento dos animais após administração da amostra por via oral. Os animais receberam, por via oral, água estéril e o extrato hexânico de MA em concentrações de 100, 500, 1000, 3000 e 5000 mg/kg. Nestas doses, não foram observadas quaisquer alterações física ou comportamental. Também não foram observados alterações clínicas ou sinais de farmacotoxicidade, não havendo nenhuma mortalidade nos grupos teste e controle. A partir desses dados, a DL₅₀ (dose, em g/kg de peso corpóreo, que determina 50% de morte dos animais) por via oral não pôde ser calculada.

Okoli & Akah (2004) confirmaram a ausência de toxicidade aguda em extratos de diferentes espécies vegetais da família Araceae. Dentre elas, o extrato metanólico de *Culcasia scandens* apresentou-se seguro após administração por via oral em ratos.

Finalmente, este trabalho demonstrou a ação antibacteriana e antioxidante de diferentes extratos das espécies vegetais *M. deliciosa* e *M. adansonii*. As atividades farmacológicas demonstradas podem representar uma possível alternativa no que tange a utilização de extratos dessas duas espécies vegetais do gênero *Monstera* em formulações para o tratamento de infecções e no combate a processos que envolvam a formação de espécies radicalares. No entanto, mais estudos se fazem necessários para avaliar os valores práticos dessas aplicações terapêuticas.

5. CONCLUSÕES

- A análise do perfil químico das frações apolares provenientes de MA e MD permitiu verificar a presença abundante de ácidos graxos, dentre eles, o ácido palmítico como constituinte majoritário.
- As subfrações obtidas a partir da purificação da fração hexânica por filtração á vácuo apresentaram como componentes majoritários os ácidos palmítico, linoléico e linolênico.
- A análise química de sub-frações obtidas do extrato em AcOEt de MD a partir da SPE evidenciou a presença majoritária de flavonóides.
- O extrato hexânico e a sub-fração HXDL₅₀ de MA apresentaram significativa atividade antibacteriana (CMI: 512 µg/ml e 1024 µg/ml, respectivamente) frente a amostras de referências e clínicas de *S. aureus*, apresentando efeito bactericida (CMB 1024µg/ml) como consequência do efeito sinérgico dos ácidos.
- Todo extratos de MA (HX, DCL, ACET, BU, AQ e BR) apresentaram atividade antibacteriana frente a amostras clínicas e padrão de *Acinetobacter baumannii* apresentando efeito bactericida.
- O mecanismo de ação envolvido na ação bactericida da sub-fração tiva HXDL₅₀ de MA foi confirmada pelo estudo da cinética de morte bacteriana.
- O extrato em acetato de etila de MD apresentou atividade antioxidante comparável ao extrato EGB761 de *G. biloba* pelo método DPPH.
- Os extratos ACET, BU e AQ de MD apresentaram considerável atividade antioxidante pelo método ORAC quando comparado ao controle TROLOX.

- O extrato hexânico de MA e em acetato de etila de MD apresentaram alta capacidade quelante de íons ferrosos comparável à quercetina, inibindo a reação de Fenton.
- O extrato hexânico e a sub- fração HXDL₅₀ de MA apresentaram baixa citotoxicidade *in vitro*.
- O extrato hexânico de MA não apresentou toxicidade aguda por via oral.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar estudos de investigação química com os extratos butanólico e aquoso de MD, com objetivo de identificar os constituintes químicos majoritários e as substâncias responsáveis pela atividade antioxidante observada;
- Realizar estudos de atividade antibacteriana e antioxidante com outras partes (caule, fruto, etc) das espécies vegetais MD e MA;
- Purificar os flavonóides presentes na fração ativa em acetato de etila de MD e testá-los isoladamente quanto ao potencial antioxidante;
- Realizar novos testes de citotoxicidade (in-vivo) objetivando validar o uso de extratos de MD e MA como possíveis novos agentes antibacterianos /antioxidantes em formulações fitoterápicas.

7. REFERÊNCIAS

- ACKER, S. A. B. V.; BALEN, G. P. V.; BERG, D. J. D.; BAST, A.; VIJGH, W.J. F. V.; **Influence of Iron Chelation on the Antioxidant Activity of Flavonoids** -- Biochemical Pharmacology, 56, 1998, p. 935–943.
- ADWAN, G; ABU-SHANAB, B; ADWAN, K.; **Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Alone and in Combination with Different Antimicrobials Against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains** -- Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2010, p.266-269.
- ANDRADE, I. M.; MAYO S. J.; VAN DEN BERG, C.; FAY, M.; CHESTER, F. M.; LEXER, C. & KIRKUP, D.; **A Preliminary Study of Genetic Variation in Populations of *Monstera adansonii* var. *klotzschiana* (Araceae) from North-East Brazil, Estimated with AFLP Molecular Markers**-- Annals of Botany, 100, 2007, p.1143-1154.
- AKTUMSEK, A.; ZENGIN, G.; GULER, G. O.; CAKMAK, Y. S.; DURAN, A.; **Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five--** Food and Chemical Toxicology, 49, 2011, p. 2914–2920.
- BARAN, G; ERBAY, A; BODUR, H; ONGURU, P; AKINCI, E; BALABAN, N; CEVIK, M. A.; **Risk factors for nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections** -- International Journal of Infectious Diseases, 12, 2008, p.16—21.
- BERGSSON, G.; STEINGRIMSSON, O.; THORMAR, H.; **Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*** -- International Journal of Antimicrobial Agents, 20, 2002, p.258-262.
- BOUÉ, S. M.; WIENTJES, C.; SHIH, B. Y.; CLEVELAND, T. E.; **Identification of flavone aglycones and glycosides in soybean pods by liquid chromatography–tandem mass spectrometry**-- Journal of Chromatography A, 991, 2003, p. 61–68.
- BYARUGABA, D. K.; **A View on Antimicrobial Resistance in Developing Countries and Responsible Risk Factors** -- International Journal of Antimicrobial Agents, 24, 2004, p.105–110.
- CAHOON, E. B & SCHMID, K. M.; **Metabolic Engineering of the Content and Fatty Acid Composition of Vegetable Oils** -- Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology, 1, 2008.
- CARBALLEIRA, N. M.; **New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents** --Progress in Lipid Research, 47, 2008, p.50–61.
- CASTILHO, P. C.; SAVLUCHINSKE, S.; WEINHOLD, T. S.; GOUVEIA, S. C.; **Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal**-- Food Contro, 23, 2012, p.552-558.

- CHAN P.K.; HAYES A.W. **Acute toxicity and eye irritancy.** In: HAYES A.W. **Principles and methods of toxicology**-- 3rd edition. New York. Raven Press Ltd., 1994.
- CHEN, J; BENNY,R.J, ; **Aroids are Important Medicinal Plants.**; Mid-Florida Research and Education Center 2007.
- CHERNENKO, T.V.; ULOCHENKO, N. T. & A. I. GLUSHENKOVA. **Glycolipids from leaves of *Eminium lehmanii*** --Chemistry of natural compounds, 2005, p.41-5.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**-- Approved Standards:M7-A6. Wayne, Pennsylvania, USA. 2003.
- COHEN, F. L; TARTASKY, D; LLLINOIS, E. **Microbial resistance to drug therapy: A review** -- AJIC Am J Infect Control, 25, 1997, p.51-64.
- CHOO, C. Y.; CHAN, K. L.; SAM, T. W.; HITOTSUYANAGI, Y.; TAKEYA, K.; **The cytotoxicity and chemical constituents of the hexane fraction of *Typhonium flagelliforme* (Araceae)**-- Journal of Ethnopharmacology, 77, 2001, p.129–131.
- COWAN, M.M. **Plant Products as Atimicrobial Agents.** *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 1999 p.564-582.
- COUTINHO, M. A. S. ET AL.; **Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos Para o Processo Inflamatório**-- Revista Virtual de Química,1, 2009, p. 241-256.
- CUSHNIE, T. P.T & LAMB, A. J.; Antimicrobial activity of flavonoids-- **International Journal of Antimicrobial Agents**, 26, 2005, p.343–356.
- DANDAN, W.; JIAN, W.; XUEHUI, H.; YING, T.; UNYIA, N.; **Identification of polymethoxylated flavones from green tangerine peel(*Pericarpium Citri Reticulatae Viride*) by chromatographic and spectroscopic techniques**-- Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 44, 2007, p.63–69.
- DE LÉON, L; LÓPEZ, M.R; MOUJIR, L. **Antibacterial properties of zeylasterone, a triterpenoid isolated from *Maytenus blepharodes*, against *Staphylococcus aureus***-- Microbiol. Res, 65, 2010, p. 617-626.
- DE LÉON L., MOUJIR L., **Activity and mechanism of the action of zeylasterone against *Bacillus subtilis*.** *The Society for Applied Microbiology*--Journal of Applied Microbiology, 104, 2008, p.1266–1274.
- DE LÉON L., LÓPEZ M. R., MOUJIR L.; **Antibacterial properties of zeylasterone, a triterpenoid isolated from *Maytenus blepharodes*, against *Staphylococcus aureus***--Research in Microbiology, 165, 2010, p.617-626.
- DEVIIENNE, K.S; RADDI, M.S.G; POZETTI, G.L. **Das Plantas Mediciniais aos Medicamentos** – Rev. Bras. PL.MED., Botucatu, 6, 2004, p.11-14.
- DEURENBERG, R.H; STOBBERINGH,E.E., **The evolution of *Staphylococcus aureus***-- Department of Medical Microbiology, The Netherlands Infection, Genetics and Evolution, 8, 2008, p.747–763.

DILIKA, F.; BREMNER, P.D. & MEYER, J.J.M. **Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumcision rites**—Fitoterapia, 71, 2000, p.450-452.

DOS SANTOS, P. M. L., JAPP A. S., LIMA L. G., SCHRIPSEMA J. MENEZES F. S. KUSTER R. M., **Antioxidant activity from the leaf extracts of *Jacaranda puberula* Cham., Bignoniaceae, a Brazilian medicinal plant used for blood depuration**-- Revista Brasileira de Farmacognosia, 20, 2010, p.147-153.

DRONDA, S. B; JUSTRIBÓ, M. V; **Will We Still Have Antibiotics Tomorrow?** Arch Bronconeumol, 43, 2007, p.450-9.

DURAI PANDIYAN, V. & IGNACIMUTHU, S.; **Antibacterial and antifungal activity of Flindersine isolated from the traditional medicinal plant, *Toddalia asiatica* (L.) Lam.**-- Journal of Ethnopharmacology, 123, 2009, p.494–498.

EMMERSON, A. M.; **The impact of surveys on hospital infection**-- Journal of Hospital Infection, 30, 1995, p.421-440.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R.; **The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. Environmental Health Perspectives**-- 109, 2001, p. 69-75.

FANGRAT, K. D. Z; ROZINEK, E; CEDRO, D. C; JAROSZ, M; PAWLOWSKA, J; SZADKOWSKI, A; BUDZYNSKA, A; RO, MANCZUK, W; PROSIECKI, R; JOZWIAKA, P; ZANOWSKA, D. D. **Antimicrobial Resistance of *Helicobacter pylori* in Poland: a Multicentre Study** -- International Journal of Antimicrobial Agents, 26, 2005, p.230–234.

FENG Y.; CHEN C. J.; SU L. H.; HU S.; YU J.; CHIU C. H.; **Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics**-- FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32, p.23–37.

FONTANAY, S; GRARE, M.; MAYER, J.; FINANCE, C.; DUVAL, R.E.; **Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes**-- Journal of Ethnopharmacology, 2008, p.272–276.

FORBES, B. A.; BOMBICINO, K.; PLATA, K.; CUIROLOB, A.; WEBBER, D.; BENDER, C. L.; ROSATOB, A. E.; **Unusual form of oxacillin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains**-- Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 61, 2008, p.387–395.

FURTADO, G.H.C; PERDIZ, L.B; SANTANA, I.L; CAMARGO, M. M. S. C. R; PARREIRA, F.C; ANGELIERI, D.B; MEDEIROS, E. A.S.; **Impact of a Hospital-wide Antimicrobial Formulary Intervention on the Incidence of Multidrug-Resistant Gram-negative Bacteria**-- Am J Infect Contro, 36I, 2008, p.661-4.

GARVEY M. I., RAHMAN M. M., GIBBONS S., PIDDOCK L. J. V., **Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against Gram-negative bacteria**-- International Journal of Antimicrobial Agents, 37, 2011, p.145–151.

GIAMARELLOU, H; ANTONIADOU, A; KANELLAKOPOULOU, K. **Acinetobacter baumannii: a universal threat to public health?**--International Journal of Antimicrobial Agents, 32, 2008, p.106–119.

GOLD H. S., PILLAI S. K.; **Antistaphylococcal agents**-- Infectious Disease Clinics of North America, 23, 2009, p.99-131.

GONÇALVES L. O.; d□ALBUQUERQUE I. L.; MARINI-BETTTÓLO G. B.; COELHO J.S. B.; CAVALCANTI M. S. B.; MARTINS D. G., OLIVEIRA L. L.; **Substâncias Antimicrobianas de Plantas Superiores**-- Revista do Instituto de Antibiótico, 1970a p.10:29.

GONÇALVES L. O., d□ALBUQUERQUE I. L., MARINI-BETTTÓLO G. B., COELHO J.S. B., CAVALCANTI M. S. B., MARTINS D. G., OLIVEIRA L. L.; **Substâncias Antimicrobianas de Plantas Superiores**-- Revista do Instituto de Antibiótico, 1970b, p.10:35.

GORDON R. J., LOWY, F. D., **Pathogenesis of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection**--Clinical Infectious Diseases, 46, 2008, p.S350–S359.

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

HABBAL, O.; HASSON, SS.; EL-HAG, A. H.; MAHROOQI, A.; HASHMI, A. L.; BIMANI, Z.; BALUSHI, A. L.; JABRI, A.; **Antibacterial activity of Lawsonia inermis Linn (Henna) against Pseudomonas aeruginosa**--Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2011, p.173-176.

HASHEM, F.A. & SALEH, M.M. **Antimicrobial components of some Cruciferae plants. (Diplotaxis harra Forsk and Erucaria microcarpa Boiss)**-- Phytotherapy Research, 13, 1999, p.329-332.

HARBARTH, S. & SAMORE, M.H.; **Antimicrobial Resistance Determinants and Future Control**-- Emerg. Infect. Dis., 11, 2005, p.794-801.

HARTMANN, T.; **From Waste Products to Ecochemicals: Fifty Years Research of Plant Secondary Metabolism** – Phytochemistry, 68, 2007, p. 2831–2846.

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

HEYWOOD, V. H.; **Flowering plants of the world. Oxford University Press**-- New York, 1993, p.336.

HUANG, C. B.; GEORGE, B.; EBERSOLE, J. L.; **Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms** --archives of oral biology, 55, 2010, p.555–560.

ISENBERG H. D., **Antimicrobial susceptibility testing. Tests to assess bactericidal Activity**-- Clinical Microbiology Procedures Handbook, 1, 1992 p.5-16.

KAMATOU,G.P.P; VUURENS.F.V; HEERDENF.R.V; SEAMAN,T; VILJOEN, A.M;
Antibacterial and antimycobacterial activities of South African *Salvia* species and isolated compounds from *S. chamelaeagnea*-- South African Journal of Botany , 73, 2007, p.552-557.

KINTZIOS, S.; PAPAGEORGIU, K.; YAKOUMETTIS, L.; CEVIC, D. B.; SAR, A. K.;
Evaluation of the antioxidants activities of four Slovene medicinal plant species by traditional and novel biosensory assays-- Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 53, 2010, p.773–776.

KOOCHAK, H; SEYYEDNEJAD, S.M; MOTAMEDI, H.; **Preliminary Study on the Antibacterial Activity of Some Medicinal Plants of Khuzestan (Iran)**-- Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2010 ,p.180-184.

KOSINA, P.; GREGOROVA, J.; GRUZ, J.; VACEK, J.; KOLARD, M. VOGEL, M.; ROOS, W.; NAUMANN, k.; SIMANEK, V.; ULRICHOVA, J.; **Phytochemical and antimicrobial characterization of *Macleaya cordata* herb**—Fitoterapia, 81, 2010, p.1006–1012.

KUETEA, V; NGAMENI, B; SIMOC; C.C; TANKEUC, R. KENGAP; NGADJUI, B. T; MEYERD, J.J.M; LALL, N; KUIATEA, J.R.; **Antimicrobial Activity of the Crude Extracts and Compounds from *Ficus Chlamydocarpa* and *Ficus Cordata* (Moraceae)**-- Journal of Ethnopharmacology, 120, 2008, p.17–24.

KUMAR, C. G; MONGOLLA, P; JOSEPH, J; NAGESWAR, Y.V.D; KAMAL, A.; **Antimicrobial Activity from the Extracts of Fungal Isolates of Soil and Dung Samples from Kaziranga National Park, Assam, India**-- Journal de Mycologie Médicale, 20, 2010, p.283-289.

LEAL I. C. R.; **Investigação Química e Avaliação da Atividade antibacteriana de espécies vegetais e determinação estrutural de produtos de biotransformação microbiana**-- Dissertação de Doutorado, UFRJ, 2007.

LEAL I. C. R., DOS SANTOS K. R. N., JÚNIOR I. I., ANTUNES O. A. C., PORZEL A. WESSJOHANN L., KUSTER R. M.; **Ceanothane and lupane type triterpenes from *Zizyphus joazeiro* – an anti-Staphylococcal evaluation**, Planta Medica, 76, 2010, p.47-52.

LEAL, I.C. R.; JUNIOR, I. I.; PEREIRA, E. M.; LAPORT, M. S.; KUSTER, R. M.; SANTOS.; K. R. N.; **Pentaclethra macroloba tannins fractions active against methicillin-resistant staphylococcal and Gram-negative strains showing selective toxicity** -- Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2011.

LEWIS, M.T.; GALES, A.C.; SADER, H.S.; PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; **Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from Latin America patients with a diagnosis of pneumonia: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998)**--Diag. Microbiol. Infect. Dis. 37, 2000, p.63-74.

LEISER, J.J.; TOGNIM, M. C.B; BEDENDO, J.; **Infecções hospitalares em um centro de terapia intensiva de um hospital de ensino no Norte do Paraná--** Cienc Cuid Saude 6, 2007, p.181-186.

LIMA, M.R.F; LUNA,J.S; SANTOS, A.F; ANDRADE, M.C.C; SANTANA, A.E.G; GENET, J.P; MARQUEZ, B.M; NEUVILLE. L; MOREAU, N.; **Anti-bacterial Activity of Some Brazilian Medicinal Plants --**Journal of Ethnopharmacology 105, 2006, p.137–147.

LIU, J.; WANG, C.; WANG, Z.; ZHANG, C.; LU, S.; LIU, J.; **The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays L.*) and related flavone glycosides--**Food Chemistry, 126, 2011, p.261–269.

LONG, D. D.; YUAN-YUAN, Z.; FEN, C. X.; XIN- YI, H.; SHI-LAN, F.; **Advances in Application of High-Speed Countercurrent Chromatography in Separation and Purification of Flavonoids--** Chin J Anal Chem, 39, 2011, p.269–275.

LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; LIMA, M. H.; **Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions--** Biochimica et Biophysica Acta 1472, 1999, p.142-152.

MACHADO T. B., LEAL I. C. R., KUSTER R. M., AMARAL A. C. F., KOKIS V., SILVA M. G. & SANTOS K. R. N., **Brazilian Phytopharmaceuticals – Evaluation Against Hospital Bacteria--**Phytotherapy Research, 19, 2005, p.519-525,.

MAYO, S.J.; BOGNER , J.; BOYCE, PC. **The genera of Araceae--**London: Royal Botanic Gardens Kew, 380, 1997, p.36-42.

MAYO, S.J. and BARROSO, M. G.; **A new pedate-leaved species of *Philodendron* from Bahia, Brazil—**Aroideana, 2, 1997, p.82-94.

MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; PIGNATARI, A. C. C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P. R. P.; MEDEIROS, E. A. S.; RIBEIRO, J.; GIRA, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; BRITES, C.; PEREIRA, C. A. P.; REIS, M.; SOUZA, M. A.; TRANCHESI, R.; BARATA, C. U.; EDMOND, M. B.; **Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study—**Journal of Clinial Microbiology, 2011, p. 1866–1871.

MARISWAMY, Y.; GNARAJ, W. E.; ANTONISAMY, J. M.; **Chromatographic fingerprint analysis on flavonoids constituents of the medicinally important plant *Aerva lanata L.* by HPTLC technique--** Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine; 2012, p.S8-S12.

MEDINA I., TOMBO I., SATUÉ-GRACI, M. T., GERMAN J. B., FRANKEL E. N., **Effects of Natural Phenolic Compounds on the Antioxidant Activity of Lactoferrin in Liposomes and Oil-in-Water Emulsions--** Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50, 2002, p.2392-2399.

MEIJA A, Juris & SOUKUP, V. G. **Phenyl-terminated fatty acids in seeds of various aroids—**Phytochemistry, 65, 2004, p.2229–2237.

MENSOR L. L., MENEZES F. S., LEITÃO G. G., REIS A. S., DOS SANTOS T. C., COUBE C. S., LEITÃO S. G., **Screening of brasilian plant extratcs for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method**-- *Phytotherapy Research*, 2001, 15, p.127-130.

MILLAR, A. A.; SMITH, M. A. KUNST, L.; **All fatty acids are not equal: discrimination in plant membrane lipids**—*Phytochemistry*, 5, 2000, p.1360– 1385.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K.; **Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results**-- *Food Chemistry* 130, 2012, 1036–1043.

MOLYNEUX P.; **The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity**--*Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 2004, p.211-219.

MLADENKA, P.; MACAKOVÁ, K.; FILIPSKY, T.; ZATLOUKLOVÁ, L.; JAHODAR, L.; BOVICELIC, P.; SILVESTRIC, I. P.; HRDINA, R.; SASO, L.; **In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids**--*Journal of Inorganic Biochemistry* ,105 , 2011, p.693–701.

MOOR, P; FERGUNSON, S.; **Nosocomial infections in the critically ill -- ANAESTHESIA AND INTENSIVE CARE MEDICINE**, 2006, p.7:5.

MOTAMED, S.; NAGHIBI, F.; **Antioxidant activity of some edible plants of the Turkmen Sahra region in northern Iran**-- *Food Chemistry*, 119, 2010, p.1637–1642.

MOTAOUAKKIL, S; CHARRA,B; HACHIMI, A; ELMADAGHRI, N; BENBACHIR, M.; **Colistin and rifampicin in the treatment of nosocomial infections from multiresistant *Acinetobacter baumannii***-- *Journal of Infection*, 53, 2006, p.274 e 278.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**, 20th ed. Approved Standard: M07-A8, Pacific Beach Biosciences, 2010.

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

NGWENDSON, J.N.; BEDIR, E.; EFANGE, S.M.; OKUNJI, C.O.; IWU, M.M.; SCHUSTER, B.G. & KHAN, I.A. **Constituents of *Peucedanum zenkeri* seeds and their antimicrobial effects**—*Pharmazie*, 2003, p.58.

OLAECHEA, P.M; INSAUSTI, J; BLANCO, A; LUQUE, P. **Epidemiologia e impacto de las infecciones nosocomiales** -- *Med Intensiva*, 34, 2010, p.256–267.

OLIVEIRA, I.; SOUSA, A.; MORAIS, J. S.; FERREIRA, I. C. F. R; BENTO, A.; ESTEVINHO, L.; PEREIRA, A.; **Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars**-- *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2008, p.1801–1807.

OU, D.; BONOMI, P.; JAOA, W.; JADKOB, S.; HARRIS, J. E.; ANDERSONB, K. M.; **The mode of cell death in H-358 lung cancer cells cultured with inhibitors of 5-lipoxygenase or the free radical spin trap, NTBN** -- Cancer Letters, 166, 2001, p.223±231.

OKOLI, C. O.; AKAH, P. A.; **Mechanisms of the anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Culcasia scandens* P. Beauv (Araceae)**--Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 79, 2004, p.473–481.

ORHAN, I.; ORHAN, D. D.; OZÇELIK. B.; **Antiviral activity and cytotoxicity of the lipophilic extracts of various edible plants and their fatty acids**-- Food Chemistry, 115, 2009, p.701–705.

PATERNÓ E.; **Richerche Sull acido lapacico**--Gazzetta Chimica Itaiana,12, 1982, p.337-92.

PAYA, J. S; BISCHOFBERGER, C; LIZAN, M; LOZANO, J; PLATON, E. M; NAVARRO, J; PAZ, J; VICENTE, J.A; **Nosocomial infection surveillance and control: current situation in Spanish hospitals**-- Journal of Hospital Infection, 72, 2009, p.50 56.

PINZI, S.; LEIVA, D.; ARZAMENDI, G.; GANDIA, L. M.; DORADO, M. P.; **Multiple response optimization of vegetable oils fatty acid composition to improve biodiesel physical properties**--Bioresource Technology, 102, 2011, p.7280–7288.

PLOWMAN, T.; **Folk Uses of New World Aroids**-- Made in United States of America, ECONOMIC BOT.ANV, 23, 1969, p. 2.

PUEYOA, M.J; GAITEB, F.B; VILLARC, R.A; MONTEROC, J.G. **Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos**-- Med Intensiva, 35, 2011, p.41-53.

PUPO. M. T.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. G. F. **A cycloartane triterpenoid and ù-phenyl alkanic and alkenic acids from *Trichilia claussenii*** - Phytochemistry, 42, 1996, p.795-798.

QUAVEA, C.L; PLANO, L.R.W; PANTUSO, T; BENNETT, B.C. **Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***--Journal of Ethnopharmacology, 118, 2008, p. 418–428.

REZANKA, T.; SCHREIBEROVÁ, O.; CEJKOVÁ, A.; SIGLER, K.; The genus *Dracunculus* – **A source of triacylglycerols containing odd-numbered x-phenyl fatty acids**—Phytochemistry, 72, 2011, p.1914–1926.

RIOS, J.L. & RECIO, M.C. **Medicinal plants and Antimicrobial activity**--J. Ethnopharmacol.100, 2005, p.80-84.

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. T.; **Analytical separation and detection methods for flavonoids**-- Journal of Chromatography A, 1112, 2006, p.31–63.

ROY, S. & CHATTERJEE, P.; **A non-toxic antifungal compound from the leaves of *Catharanthus roseus* characterized as 5-hydroxy flavone by UV spectroscopic analysis and evaluation of its antifungal property by agar-cup method**--Industrial Crops and Products, 32, 2010, p.375–380.

ROSENTHAL, V. D.; MAKI, D. G.; JAMILITRAT, S.; MEDEIROS, E. A.; TODI, S.; GOMES, D. Y.; LEBLEBICIOGLU, H.; KHADER, I. A.; NOVALES, G. M.; BERBA, R.; WONG, F. M. R.; BARKAT, A.; PINO, O. R.; DUENAS, L.; MITREV, Z.; BIJIE, H.; GURKIS, V.; KANJ, S. S.; MAPP, T.; HIDALGO, R. F.; JABALLAH, N. B.; RAKA, L.; GIKAS, A.; AHMED, A.; THU, L.; SIRITT, E. G.; MEMBERS, INICC.; **International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009**-- Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Am J Infect Control, 38, 2010, p.95-106.

RUELA H. S., LEAL I. C. R., ALMEIDA M. R. A., SANTOS K. R. N., WESSJOHANN L., KUSTER R. M., **Antibacterial and Antioxidant Activities and Acute Toxicity of *Bumelia sartorum* Mart., a Brazilian Medicinal Plant**-- Revista Brasileira de Farmacognosia, 21, 2011, p.86-91.

SABINO K.C.C, GAYER C.R.M., VAZ L.C.A., SANTOS L.R.L., FELZENSZWALB I.; COELHO M.G.P. **In vitro and in vivo toxicological study of the *Pterodon pubescens* seed oil**-- Toxicology. Letter, 108, 1999, p.27-35.

SAGALIK, S.; ALPINAR, K. & IMRE, S.; **Fatty acid composition of *Dracunculus vulgaris* Schott (Araceae) seed oil from Turkey**-- J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 5, 2002a, p.231–233.

SAGALIK, S.; ALPINAR, K. & IMRE, S. **Fatty acid composition of the seed oil of *Arum italicum* Miller**-- Journal of Food Lipids, 9, 2002b, p.95–103.

SAKANO K., MIZUTANI M., MURATA M., OIKAWA S., HIRAKU Y., KAWANISHI S., **Procyanidin B2 has anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage**, Free Radical Biology & Medicine, 39, 2005, p.1041 – 1049.

SASIKUMAR, J. M. & DOSS, P. A.; **In vitro antioxidant and antibacterial activity of *Rhaphidophora pertusa***--Fitoterapia, 77, 2006, p.605–607.

SGHAIER, M. B.; SKANDRANI, I.; NASRA, N.; FRANCA, M. G. D.; GHEDIRA, L. C.; GHEDIRA, K.; **Flavonoids and sesquiterpenes from *Tecurium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure–activity relationship study**-- environmental toxicology and pharmacology, 32, 2011, p.336–348.

STOCKHAMA, K.; PAIMIN, R.; ORBELL, J. D.; ADORNO, P.; BUDDHADASA, S.; **Modes of handling Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) data and reporting values in product labeling**-- Journal of Food Composition and Analysis, 24, 2011, p.686–691.

SCALBERT A., **Antimicrobial properties of tannins**, *Phytochemistry*, 30, 1991, p.3875-3883.

- SUFFREDINI IB, PACIENCIA ML, VARELLA AD, YOUNES RN. **Antibacterial activity of Brazilian Amazon plant extracts**-- Braz J Infect Dis, 2006, p.400-2.
- SUGANTHY, N.; ARIFNISHA, S.; PANDIAN, S. K.; DEVI, K. P.; **Antioxidant and metal chelating potential of the solvent fractions of Gelidiella acerosa, the red algae inhabiting South Indian coastal area**-- Biomedicine & Pharmacotherapy xxx, 2010, xxx–xxx.
- SUN, L.; ZHANG, J.; LU, X.; ZKANG, L.; **Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (Diospyros kaki L.) leaves**-- Food and Chemical Toxicology, 49, 2011, p. 2689–2696.
- TAM, S.M., BOYCE, P.C., UPSON, T.M. ,BARABE, D., BRUNEAU, A., FOREST, F. PARRKER, J.S., **Intergeneric and infrafamilial phylogeny of subfamily monsteroideae (Araceae) revealed by chloroplast *trnI-f* sequences**-- American Journal of Botany, 91, 2004, p.490–498.
- TANG, X; TAN, C; ZHANG, X; ZHAO, Z; XIA, X; WU, B; GUO, A; ZHOU, R; CHEN, H.; **Antimicrobial Resistances of Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli Isolates from Swine in China** -- Microbial Pathogenesis xxx , 2011, p.1e6.
- TAGURI, T., TANAKA, T., KOUNO, I., **Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease**-- Biological & Pharmaceutical Bulletin, 27, 2004, p.1965-1969.
- TAUFNER, C.F; FERRAÇO, E.B; RIBEIRO, L.F. **The Use of Medicinal Plants as an Alternative Herbal Therapy in Public Health Units at Santa Teresa and at Marilandia, ES**-- Natureza on line, 45, 2006, p.30-39.
- TEMPONI, G. & ALVES, E. G. G.; **A new Monstera (Araceae: Monsteroideae) from Brazil**-- Brittonia, 2004, p.72–74.
- TENOVER F. C., **Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria** --American Journal of Infection Control, 2006, p.3-10.
- TROMBETTA D., CASTELLI F., SARPIETRO M. G., VENUTI V., CRISTANI M., DANIELE C., SAIJA A., MAZZANTI G., BISIGNANO G., **Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes, Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 49, p,2474–2478, 2005.
- TSHIBANGU, J. N.; CHIFUNDERAB, K.; KAMINSKY, R.; WRIGHT, A. D.; KONIG, G. M.; **Screening of African Medicinal Plants for Antimicrobial and enzyme inhibitory activity**--Journal of Ethnopharmacology, 80, 2002 p.25–35.
- VICENT, J.L. **Nosocomial infections in adult intensive-care units**—Lancet, 62, 2003, 361, p.2068–77.
- VERPOORTE, R.; **Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology**-- Journal of Pharmacy and Pharmacological Sciences, 52, 2000, p. 253–262.

VICENTINO A. R. R., MENEZES F. S., **Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH--Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17, 2007, 384-387.

VONBERG, R.P; WOLTER, A; CHABEMY, I. F; KOLA, A; ZIESING, S; SUERBAUM, S; GASTMEIER, P. **Epidemiology of Multi-Drug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Data from an University Hospital Over a 36-month period -- Int. J. Hyg. Environ.-Health**, 211, 2008, p. 251–257.

VOGELAERS, D; BELS, D. D; FORÊT, F; CRAND, S; GILBERT, E; SCHOONHEYDT, K; BLOT, S.; **Patterns of antimicrobial therapy in severe nosocomial infections empiric choices, proportion of appropriate therapy, and adaptation rates—a multicentre, observational survey in critically ill patients -- International Journal of Antimicrobial Agents**, 35, 2010, p.375–381.

WANG T., JÓNSDÓTTIR R., ÓLAFSDÓTTIR G., **Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds-- Food Chemistry**, 116, 2009, p.240–248.

WEERAKKODY, N.; CAFFIN, N.; TURNER, M. S.; DYKES, G. A.; **In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria-- Food Control**, 21, 2010, p.408–414.

WORAWITTAYANON, P.; RUADREO, J.; DISADEE, W.; AHAKITPICHAN, P.; SITTHIMONCHAI, S.; KANCHNAPOOMA, T.; THASANA, N.; RUCHIRAWAT, S.; **Iridoid and flavone glycosides from *Asystasia gangetica* subsp. *Micrantha* and *Asystasia salicifolia* and their antioxidant activities--Biochemical Systematics and Ecology**, 40, 2012, p.38–42.

YFF, B.T.S.; LINDSEY, K.L.; TAYLOR, M.B.; ERASMUS, D.G.; JÄGER, A.K.. **The pharmacological screening of *Pentanisia prunelloides* and the isolation of the antibacterial compound palmitic acid--Journal of Ethnopharmacology**, 79, 2002, p.101-107.

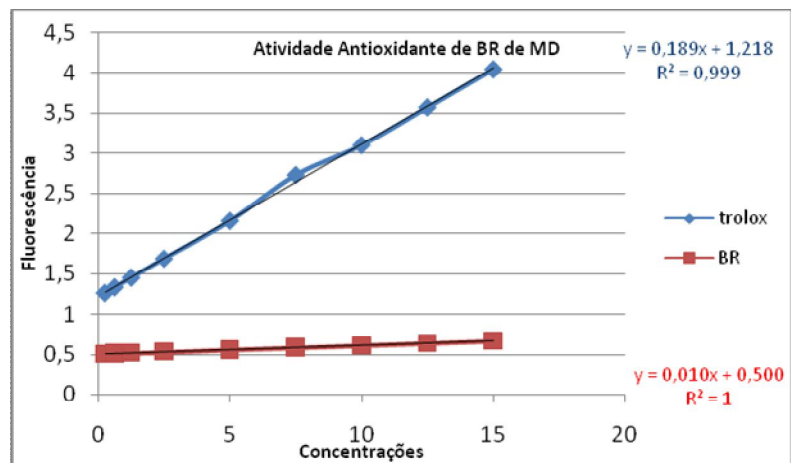
ZHANG, L. & ZHANG, Y.; **Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves--Food and Chemical Toxicology**, 49, , 2011, p.2689–2696.

ZAMPINI, I. C.; VATTUONE, M. A.; ISLA, M. I.; **Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts--Journal of Ethnopharmacology**, 123, 2009, p.494–498.

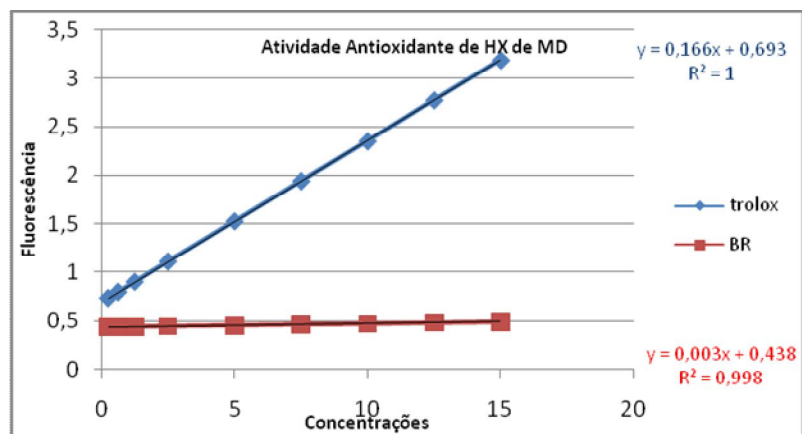
ZIELÍNSKA, D & ZIELÍNSKI, H.; **Antioxidant activity of flavone C-glucosides determined by updated analytical strategies--Food Chemistry**,124, 2011, p.672–678,.

ANEXOS

Anexo 1. Avaliação do potencial antioxidante do extrato bruto de MD pelo método ORAC.



Anexo 2. Avaliação do potencial antioxidante do extrato hexânico de MD pelo método ORAC.



Anexo 3. Avaliação do potencial antioxidante do extrato diclorometânico de MD pelo método ORAC

