

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**Estudo químico e biológico de *Microplumeria anomala*  
(Müll. Arg.) Makgr. (Apocynaceae) e *Buchenavia oxycarpa*  
(Mart.) Eichler (Combretaceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

**LIVIA ROBERTA PIEDADE CAMARGO**

**SÃO PAULO**  
**2016**

# **LIVIA ROBERTA PIEDADE CAMARGO**

**Estudo químico e biológico de *Microplumeria anômala*  
(Müll. Arg.) Makgr. (Apocynaceae) e *Buchenavia oxycarpa*  
(Mart.) Eichler (Combretaceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Barbosa Suffredini

SÃO PAULO

2016

Camargo, Livia Roberta Piedade.

Estudo químico e biológico de *Microplumeria anomala* (Müll. Arg.) Makgr. (Apocynaceae) e *Buchenavia oxycarpa* (Mart.) Eichler (Combretaceae) / Livia Roberta Piedade Camargo. - 2016.

148 f. : il. color.

Tese de Doutorado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Produtos Naturais.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ivana Barbosa Suffredini.

# **LIVIA ROBERTA PIEDADE CAMARGO**

**Estudo químico e biológico de *Microplumeria anômala*  
(Müll. Arg.) Makgr. (Apocynaceae) e *Buchenavia oxycarpa*  
(Mart.) Eichler (Combretaceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovada em:

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho durante toda minha jornada, trazendo-me saúde e prosperidade.

À minha família e ao meu noivo, pela paciência e compreensão nos dias em que precisei me ausentar da vida deles para concluir meu trabalho.

À minha querida orientadora, que me acolheu todos esses anos, aceitando-me a princípio como aluna de iniciação científica no terceiro ano da faculdade, em seguida, orientando-me no mestrado e no doutorado.

A todos os professores que colaboraram com este estudo como a Ingrid na identificação das moléculas e processos de cromatografias, o Sergio com os experimentos de citotoxicidade e preparação dos extratos, o Matheus por me orientar na identificação das plantas estudadas e a Vania por fornecer gentilmente três cepas bacterianas para os ensaios.

À equipe do laboratório (Luciela, Ivonete e Jefferson) em me auxiliar em diversas etapas dos experimentos.

A todos da banca examinadora e aos suplentes por aceitarem ler meu trabalho e auxiliarem-me a enriquecê-lo.

À CAPES pela oportunidade que me deram para desenvolver esse estudo, pois sem a bolsa fornecida eu não teria condições de dar continuidade a essa jornada.

## RESUMO

*Escherichia coli* é um dos patógenos responsáveis por doenças veterinárias, que causam prejuízos econômicos decorrentes do declínio da saúde de animais de produção e dos animais de companhia, causando impacto emocional nos proprietários. Por essa razão, a introdução de novos fármacos antibióticos é imprescindível. A rica biodiversidade brasileira apresenta potencial para descoberta de novos fármacos. A partir de triagem biológica de 1791 extratos vegetais obtidos de mais de 600 espécies, realizada em um modelo de disco difusão em ágar e com quatro cepas de *E. coli*, foram identificados dois extratos vegetais ativos. O primeiro, oriundo do caule de *Microplumeria anomala* (Apocynaceae) e denominado EB127, e o segundo, oriundo dos frutos de *Buchenavia oxycarpa* (Combretaceae) e denominado EB725. EB127 foi estudado em termos de sua composição química, utilizando-se métodos de partição e cromatografias para o fracionamento e métodos espectroscópicos para a identificação das moléculas. As frações enriquecidas e compostos isolados foram testados contra as quatro bactérias, a fim de se identificar os compostos que apresentavam atividade antibacteriana. Foram identificados por meio da ressonância magnética nuclear as moléculas de lupeol, sitosterol, estigmasterol, 3-acetil-11-oxo-β-amirina, 3-acetil-11-oxo-α-amirina, 3β,7α-dihidroxi-colest-5-eno, 3β-hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3β-hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona, sendo algumas identificadas na espécie pela primeira vez.. E por meio da cromatografia líquida de alta eficiência de espectrometria de massas sugerem-se também a presença de ácido dihidrobenzóico hexosídeo; ácido rosmarínico; um dos isômeros ácido 8-*epi*-loganínico ou ácido loganínico; 8-*epi*-logânico ou loganino; um dos isômeros do éster secologanosídeo-7-metila ou secologanino; ácido 4-O-feruloilquínico; ácido vanílico glicosilado; ácido procatecuico glicosilado; ácido cafeoilquinico; ácido metil dicafeoilquinico e cafeoil hexosídeo encontrados na fração 10%ACN da fase de partição H<sub>2</sub>O, obtida do extrato orgânico e que apresentou atividade antibacteriana significativa frente à bactéria *E. coli* resistente a antibióticos. EB725 também foi fracionado e testado contra as mesmas bactérias, aplicando-se a mesma metodologia. Para esse extrato, a atividade antibacteriana mais significativa foi verificada nas frações DCM da fase de partição CHCl<sub>3</sub>, 10%ACN da fase de partição BuOH e 10%ACN da fase de partição H<sub>2</sub>O. Em termos efetivos, as frações e

compostos que apresentaram atividade contra a bactéria de *E. coli* resistente foram considerados os mais interessantes, e os compostos identificados nessas frações.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* is one of the pathogens responsible for veterinary diseases, which cause economic losses arising from the decline in the health of farm animals and pets, causing emotional impact on owners. The rich biodiversity brazilian presents potential for drug discovery. From 1791 biological screening plant extract obtained from more than 600 species, held in a disk agar diffusion model and with four strains of *e. coli*, were identified two active plant extracts. The first, from stem of *Microplumeria anomala* (Apocynaceae) and name EB127, and the second of *Buchenavia oxyacarpa* (Combretaceae) and named EB725. EB127 has been studied in terms of their chemical composition, using methods of partition and chromatograms for the fractionenriched and spectroscopic methods for the identification of molecules. The fractionenriched and isolated compounds were tested against the four bacteria in order to identify the compounds with antibacterial activity. Were identified by nuclear magnet resonance of molecules lupeol, sitosterol, stigmasterol, 3-acetyl-11-oxo- $\beta$ -amyrin, 3-acetyl-11-oxo- $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -3 -7  $\alpha$ -dihydroxy-5-ene colest,  $\beta$ -hydroxy 3-colest-5-en-7-one and  $\beta$ -hydroxy 3-colest-5.22-dien-7-ona, with some identified in species for the first time. And by high efficiency liquid chromatography mass spectrometry also suggested the presence of dihidrobenzóico acid hexosídeo; rosmarinic acid; one of the isomers 8-*epi*-loganílico acid or loganílico acid; 8-*epi*-logânic or loganino; one of the secologanosídeo ester isomers-7-methy ou secologanino; 4-O-feruloilquinico acid; vanilic acid glicosilado; procatecuico acid glicosilado; cafeoilquinico acid; methyl dicafeoilquinico and cafeoil hexosídeo acid found in 10%ACN fraction partition phase H<sub>2</sub>O, obtained from organic extract and that showed significant antibacterial activity in front of the *e. coli* bacteria resistant to antibiotics. EB725 was also split and tested against the same bacteria, applying the same methodonlogy. For this extract significant antibacterial activity was detected in the farctions DCM partition phase CHCl<sub>3</sub>, 10%ACN partition phase BuOH and 10%ACN partitionphase H<sub>2</sub>O. In effective terms, the fractions and compouds showed activity against bacteria of resistant *e. coli* were found to be most interesting, and the compounds identified in these fractions.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Preparação do EB 127, de *Microplumeria anomala*, por meio da maceração sendo adicionado diclorometano:metanol na proporção de 1:1.\_\_\_\_18
- Figura 2 – Fluxograma representativo do fracionamento dos extratos bruto de *Microplumeria anomala* e *Buchenavia oxycarpa*, usando técnicas de partição líquido-líquido e técnicas de cromatografia em coluna C-18 e Sephadex LH-20, que resultaram em nove frações.\_\_\_\_20
- Figura 3 - Cromatografia em camada delgada analítica das amostras gerada das frações do EB127 de *Microplumeria anomala*, eluídas duas vezes em hexano: acetato de etila, na proporção de 2:1.\_\_\_\_21
- Figura 4 - Cromatografia em camada delgada analítica da amostra gerada das frações do EB127 de *Microplumeria anomala* eluídas duas vezes em clorofórmio: acetato de etila: metanol, na proporção de 2:2:0,25/0,5/0,75/1 e reveladas com reagente de Dragendorff.\_\_\_\_22
- Figura 5 - **(a)** Amostra 2267 de *Microplumeria anomala* triturada e separada em três partes iguais para fazer a extração dos alcalóides totais a partir da planta. **(b)** Extração de alcalóides totais a partir da planta *Microplumeria anomala* no processo de descanso da amostra embebida em diclorometano e hidroxido de amônio.\_\_\_\_25
- Figura 6 – Fluxograma representativo da extração de alcaloides totais a partir da espécie vegetal *Microplumeria anomala* em meio alcalino e meio ácido.\_\_\_\_27
- Figura 7- Teste com o reagente de dragendorff para verificação da presença de alcalóides.\_\_\_\_28
- Figura 8 - Fluxograma da extração de alcaloides totais dos extratos brutos de *Microplumeria anomala* (EB127) e *Buchenavia oxycarpa* (EB725) pelo método ácido.\_\_\_\_29
- Figura 9 - Extração de alcalóides totais a partir do EB 725 de *Buchenavia oxycarpa* no processo de adição do hexano.\_\_\_\_29

- Figura 10- Cromatograma (UV,  $\lambda=254$  nm) da amostra 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_37
- Figura 11- Cromatograma ampliado nos primeiros 28 minutos de corrida da amostra 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_38
- Figura 12 - Cromatoíons no modo negativo da amostra 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127 de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_38
- Figura 13 - Cromatoíons no modo negativo ampliado nos primeiros 20 minutos da amostra 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_39
- Figura 14 - Espectro ESI<sup>-</sup> do pico aos 12,3 min originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_40
- Figura 15- Espectro no modo negativo MS<sup>1</sup> de [M-H]<sup>-</sup> (*m/z* 315) ácido dihidrobenzoico hexosídeo, obtido a partir da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_40
- Figura 16 - Estrutura molecular de ácido dihidrobenzoico hexosídeo (M<sub>1</sub>) obtido a partir da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_41
- Figura 17 - Espectro no modo negativo MS<sup>2</sup> de [M-H]<sup>-</sup> (*m/z* 359) ácido rosmarínico obtido a partir da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_41
- Figura 18 - Estrutura molécula de ácido rosmarínico (M<sub>2</sub>), obtido a partir da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_42
- Figura 19 - Espectro ESI<sup>-</sup> do pico aos 12,6 min originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_43

Figura 20 - Espectro no modo negativo  $MS^2$  de  $[M-H]^-$  ( $m/z$  375,10) é um iridoide originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 43

Figura 21 - Estrutura molecular de um iridoide com peso molecular 376 originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 44

Figura 22 - Espectro ESI<sup>-</sup> do pico aos 13,4 min. originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 44

Figura 23 - Espectro no modo negativo  $MS^2$  de  $[M-H]^-$  ( $m/z$  389,08) é um iridoide originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 45

Figura 24 - Estrutura molecular do iridoide com peso molecular 390 originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 45

Figura 25 - Espectro ESI<sup>-</sup> do pico aos 15,0 min originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 46

Figura 26 - Espectro no modo negativo  $MS^2$  de  $[M-H]^-$  ( $m/z$  403,13) do iridoide originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 46

Figura 27 - Estrutura molecular do iridoide com peso molecular 404 originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 47

Figura 28 - Espectro ESI<sup>-</sup> do pico aos 38,7 min originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 47

Figura 29 - Espectro no modo negativo  $MS^2$  de  $[M-H]^-$  ( $m/z$  367,21) é um ácido feruloilquínico originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 48

Figura 30 - Estrutura molecular do ácido 4-O-feruloilquínico originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 48

Figura 31 - Espectro de massas ESI<sup>-</sup> no modo negativo da amostra UNIP-362 a 10,4 min, da qual se isolou o ácido vanílico originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127 de *Microplumeria anomala*. 49

Figura 32 - Espectro de massas no modo negativo de  $MS^2$  de  $m/z$  329,08  $[M-H]^-$  da amostra UNIP-362, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 49

Figura 33 - Estrutura molecular do ácido vanílico glicosilado originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 50

Figura 34 - Espectro de massa ESI<sup>-</sup> no modo negativo da amostra UNIP-364 a 14,1 min, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 50

Figura 35 - Espectro de massas no modo negativo de  $MS^2$  de  $m/z$  315,02  $[M-H]^-$  da amostra UNIP-364, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 51

Figura 36 - Estrutura molecular do ácido protocatecuico glicosilado originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 51

Figura 37- Espectro de massa ESI<sup>-</sup> no modo negativo da amostra UNIP-368 a 45,1 min, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*. 52

Figura 38 - Espectro de massas no modo negativo de  $MS^2$  de  $m/z$  367,13 [M-H]<sup>-</sup> da amostra UNIP-368, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 52

Figura 39 - Estrutura molecular do ácido cafeoil-CH<sub>2</sub>-O-quinico originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 52

Figura 40 - Espectro de massas no modo negativo de  $MS^2$  de  $m/z$  403,11 [M-H]<sup>-</sup> da amostra UNIP-368, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 53

Figura 41 - Estrutura molecular do secologanino, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 53

Figura 42 - Espectro de massa ESI<sup>-</sup> no modo negativo da amostra UNIP-369 a 28,4 min, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 54

Figura 43 - Espectro de massas no modo negativo de  $MS^2$  de  $m/z$  529,26 [M-H]<sup>-</sup> da amostra UNIP-369, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 54

Figura 44 - Estrutura molecular do ácido metil dicafeoilquinico.originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 55

Figura 45 - Espectro de massa ESI<sup>-</sup> no modo negativo da amostra UNIP-369 a 50,4 min, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 55

Figura 46 - Espectro de massas no modo negativo de  $MS^2$  de  $m/z$  539,16 [M-H]<sup>-</sup> da amostra UNIP-369, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 56

- Figura 47 - Espectro de massa ESI<sup>-</sup> no modo negativo da amostra UNIP-365 a 22,7 min, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 56
- Figura 48- Espectro de massas no modo negativo de MS<sup>2</sup> de *m/z* 375,12 [M-H]<sup>-</sup> da amostra UNIP-365, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 57
- Figura 49 - Estrutura molecular do ácido logânico, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 57
- Figura 50 - Espectro de massa ESI<sup>-</sup> no modo negativo da amostra UNIP-365 a 26,6 min, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 58
- Figura 51 - Espectro de massas no modo negativo de MS<sup>2</sup> de *m/z* 389,08 [M-H]<sup>-</sup> da amostra UNIP-365, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 58
- Figura 52 - Estrutura molecular do iridoide logânino, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 58
- Figura 53 - Estrutura molecular do lupeol originado das frações de hexano e diclorometano da fase de partição CHCl<sub>3</sub> do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 60
- Figura 54 - Estrutura molecular de 3-acetil-11-oxo-β-amirina e 3-acetil-11-oxo-α-amirina originado das frações de hexano e diclorometano da fase de partição CHCl<sub>3</sub> do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 62
- Figura 55 - Estrutura molecular de sitosterol e estigmasterol originado das frações de hexano e diclorometano da fase de partição CHCl<sub>3</sub> do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 64

- Figura 56 - Estrutura molecular de  $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi-colest-5-eno originado das frações de hexano e diclorometano da fase de partição  $\text{CHCl}_3$  do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 66
- Figura 57- Estrutura molecular de  $3\beta$ -hidroxi-colest-5-en-7-ona e  $3\beta$ -hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona originado das frações de hexano e diclorometano da fase de partição  $\text{CHCl}_3$  do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 68
- Figura 58 – Fluxograma da origem das amostras identificadas extraídas das frações de hexano e diclorometano da fase de partição  $\text{CHCl}_3$  e pressupõe a presença de outras presentes no fração 10%ACN da fase de partição  $\text{H}_2\text{O}$  originados do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 70
- Figura 59 - Representação das estruturas moleculares identificadas, das quais oram extraídas do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 71
- Figura 60 – Análise da origem dos alcaloides encontrados nas frações de hexano, diclorometano e metanol da fase de partição  $\text{CHCl}_3$  do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 73
- Figura 61 - Estrutura molecular de metilanomalina originado das frações de hexano, diclorometano e metanol da fase de partição  $\text{CHCl}_3$  do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 74
- Figura 62 - Estrutura molecular de anomalina originado das frações de hexano, diclorometano e metanol da fase de partição  $\text{CHCl}_3$  do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_ 76
- Figura 63 - Comparação dos perfis cromatográficos de AT2267 (azul, vermelho e verde escuro), alcaloides totais obtidos do caule de *Microplumeria anomala* pelo método alcalino e de EB127(rosa, verde claro e lilás), extrato bruto obtido do caule da mesma espécie. Os comprimentos de onda selecionados foram 259, 226 e 254 nm.\_\_\_\_\_ 79
- Figura 64 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência dos alcaloides totais (AT2268) extraídos do caule do extrato bruto de *Microplumeria anomala* método ácido.\_\_\_\_\_ 80

Figura 65 - Espectro de massa ESI<sup>+</sup> no modo positivo da amostra ade alcaloides totais do EB127 meio ácido a 44,9 min, originado da fração Hexano, diclorometano e metanol da fase de partição CHCl<sub>3</sub>, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_81

Figura 66 - Espectro de massas no modo positivo de MS<sup>2</sup> de *m/z* 387,29 [M+H]<sup>+</sup> da amostra de alcaloides totais de EB127 meio ácido, originado da fração Hexano, diclorometano e metanol da fase de partição CHCl<sub>3</sub>, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_81

Figura 67 - Cromatoíons no modo positivo da amostra de alcaloides totais de EB127 obtido pelo meio ácido, originado da fração Hexano, diclorometano e metanol da fase de partição CHCl<sub>3</sub>, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.\_\_\_\_\_82

Figura 68 - Resultados obtidos do ensaio da disco difusão em ágar, no qual o EB127 obtido de *Microplumeria anomala* foi testado contra quatro cepas de *Escherichia coli*. Diferenças estatísticas foram obtidas a partir de análise de variância do tipo ANOVA de uma entrada, com análise posterior de Dunnett. Significância  $\alpha<0.05$ .\_\_\_\_\_83

Figura 69 - Resultados obtidos da análise antibacteriana de EB127 e suas frações frente a cepas de *Escherichia coli*, no modelo de disco difusão em ágar. Resultados obtidos por análise de variância do tipo ANOVA de uma entrada, com análise posterior de Dunnet. Significância  $\alpha<0.05$ .\_\_\_\_\_85

Figura 70 - Resultados obtidos da análise antibacteriana de EB127, seis amostras isoladas e clorexidina frente a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, no modelo de disco difusão em ágar. Resultados obtidos por análise de variância do tipo ANOVA de uma entrada, com análise posterior de Dunnet. Significância  $\alpha<0.05$ .\_\_\_\_\_87

Figura 71 - Avaliação a da ação antimicrobiana do extrato bruto e suas frações de *Buchenavia oxycarpa* frente a quatro cepas de *Escherichia coli*, pelo ensaio da disco difusão em ágar.\_\_\_\_\_93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Patogenicidade das três cepas de <i>Escherichia coli</i> , coletadas de cloaca de aves marinhas.	31
Tabela 2 - Dados botânicos e de coleta do caule de <i>Microplumeria anomala</i> cujo extrato foi ativo contra <i>Escherichia coli</i> foi selecionado em trabalhos prévios (CAMARGO; SUFFREDINI, 2014).	36
Tabela 3: Massas das fases de partição geradas e suas frações a partir do fracionamento do extrato bruto EB127, de <i>Microplumeria anomala</i> .	37
Tabela 4. Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de C13 (CDCL3) para o iridoide loganino isolado do caule de <i>Microplumeria anomala</i> (Myristicaceae) e comparação com a literatura.	59
Tabela 5. Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de C13 (CDCL3) para o lupeol isolado do caule de <i>Microplumeria anomala</i> (Myristicaceae) e comparação com a literatura.	61
Tabela 6. Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de C13 (CDCL3) para 3-acetil-11-oxo-β-amirina e 3-acetil-11-oxo-α-amirina isolados do caule de <i>Microplumeria anomala</i> (Myristicaceae) e comparação com a literatura.	63
Tabela 7. Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de C13 (CDCL3) para sitosterol e estigmasterol isolados do caule de <i>Microplumeria anomala</i> (Myristicaceae) e comparação com a literatura.	65
Tabela 8. Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de C13 (CDCL3) para 3β,7α-dihidroxi-colest-5-eno isolado do caule de <i>Microplumeria anomala</i> (Myristicaceae) e comparação com a literatura.	67
Tabela 9. Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de C13 (CDCL3) para 3β-hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3β-hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona isolados do caule de <i>Microplumeria anomala</i> (Myristicaceae) e comparação com a literatura.	69

Tabela 10.- Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de metilanomalina isolada do caule de <i>Microplumeria anomala</i> (Myristicaceae). Deslocamento químico de RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz) e RMN- <sup>13</sup> C (125 MHz) de metilanomalina (δ ppm)._____	75
Tabela 11 : Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de anomalina isolada do caule de <i>Microplumeria anomala</i> (Myristicaceae). Deslocamentos químicos de anomalina (δ em ppm, CD <sub>3</sub> OD, 500MHz e 125 MHz)_____	77
Tabela 12.- Rendimentos da fração de alcaloides totais (AT2267) obtida do caule de <i>Microplumeria anomala</i> e de suas frações._____	78
Tabela 13: Rendimentos obtidos da extração de alcaloides totais a partir do extrato bruto EB127, de <i>Microplumeria anomala</i> método ácido e de suas frações._____	80
Tabela 14 - Avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas do EB127 por, contra as bactérias <i>Escherichia coli</i> ATCC2921325922, <i>E. coli</i> 31/1A, <i>E. coli</i> 35A e <i>E. coli</i> 51A no modelo da disco difusão em ágar._____	84
Tabela 15 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) obtidas da ação do EB127 contra quatro cepas de <i>Escherichia coli</i> em concentrações de 1,5 x10 <sup>2</sup> , 1,5 x10 <sup>3</sup> e 1,5 x10 <sup>4</sup> UFC/mL._____	87
Tabela 16 - Resultados obtidos da análise da citotoxicidade do extrato bruto EB127, dos alcaloides totais AT2267 e suas frações e dos alcaloides totais AT2268 sobre células tumorais de mama (MCF-7)._____	88
Tabela 17 - Resultados obtidos da análise da citotoxicidade do extrato bruto EB127, dos alcaloides totais AT2267 e suas frações e dos alcaloides totais AT2268 sobre células tumorais de próstata (PC-3)._____	89
Tabela 18 – Dados botânicos e de coleta dos frutos de <i>Buchenavia oxycarpacujo</i> extrato foi ativo contra <i>Escherichia coli</i> foi selecionado em trabalhos prévios (CAMARGO; SUFFREDINI, 2014)._____	90
Tabela 19 - Avaliação dos pesos das frações e das fases de partição geradas do fracionamento do extrato bruto de <i>Buchenavia oxycarpa</i> ._____	91

Tabela 20: Rendimentos gerados da extração de alcaloides totais a partir do extrato bruto de *Buchenavia oxycarpa* método ácido.\_\_\_\_\_92

Tabela 21 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) obtidas da ação do extrato bruto de *Buchenavia oxycarpa* contra quatro cepas de *Escherichia coli* em concentrações de  $1,5 \times 10^2$ ,  $1,5 \times 10^3$  e  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL.\_\_\_\_\_94

Tabela 22 - Resultados obtidos da análise da citotoxicidade do extrato bruto de *Buchenavia oxycarpa* sobre células tumorais de mama (MCF-7) e de próstata (PC-3).\_\_\_\_\_94

## ANEXOS

- Figura 1: Estrutura molecular dos alcaloides indólicos: anomalina, 12-O-metilanomalina e dimetoxilanomalina identificados em *Microplumeria anomala*. 118
- Figura 2 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) da amostra de lupeol (UNIP 217), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*. 119
- Figura 3 - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) da amostra de lupeol (UNIP-217), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*. 119
- Figura 4 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) da amostra de lupeol (UNIP-250), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*. 120
- Figura 5 - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) da amostra de lupeol (UNIP-250), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*. 120
- Figura 6 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) da mistura de 3-acetil-11-oxo-β-amilrina e 3-acetil-11-oxo-α-amilrina (UNIP-257), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*. 121
- Figura 7- Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) da mistura de 3-acetil-11-oxo-β-amilrina e 3-acetil-11-oxo-α-amilrina (UNIP-257), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*. 121
- Figura 8 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) da mistura sitosterol e estigmasterol (UNIP-271), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*. 122
- Figura 9- Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) da mistura de sitosterol e estigmasterol (UNIP-271), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*. 122
- Figura 10- Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de 3β,7α-dihidroxi-colest-5-eno (UNIP-274), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*. 123

Figura 11 - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) de 3β,7α-dihidroxi-colest-5-eno (UNIP-274), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*. 123

Figura 12- Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) da mistura 3β-hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3β-hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona (UNIP-283), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*. 124

Figura 13 - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) da mistura de 3β-hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3β-hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona (UNIP-283), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*. 124

Figura 14 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de anomalina em CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, originada do EB127 de *Microplumeria anomala*. 125

Figura 15 - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de anomalina em CD<sub>3</sub>OC, 125 MHz, originada do EB127 de *Microplumeria anomala*. 125

Figura 16 - Cromatograma dos alcaloides totais do EB 725, de *Buchenavia oxyacarpa*, submetido ao gradiente T<sub>0→5min</sub> 5% ACN, T<sub>5→35min</sub> 100% ACN, T<sub>35→40min</sub> 100% ACN, T<sub>40→50min</sub> 5% ACN, λ = 254 nm, fluxo de 1 mL/min. 126

Figura 17 - Cromatograma dos alcaloides totais do EB725 de *Buchenavia oxyacarpa*, submetido ao gradiente T<sub>0→10min</sub> 5% ACN, T<sub>10→11min</sub> 10% ACN, T<sub>11→20min</sub> 10% ACN, T<sub>20→21min</sub> 20% ACN, T<sub>21→40min</sub> 20% ACN, T<sub>40→41min</sub> 27% ACN, T<sub>41→60min</sub> 27% ACN, T<sub>60→61min</sub> 32% ACN, T<sub>61→68min</sub> 32% ACN, T<sub>68→69min</sub> 39% ACN, T<sub>69→85min</sub> 39% ACN, T<sub>85→86min</sub> 50% ACN, T<sub>86→96min</sub> 50% ACN, T<sub>96→106min</sub> 100% ACN, T<sub>106→110min</sub> 100% ACN, T<sub>110→120min</sub> 5% ACN, λ = 254 nm, fluxo de 1mL/min. 127

## LISTA DE ABREVIAÇÕES, SIGLAS E FÓRMULAS

$\mu$ =Microlitro

AAO=Sigla referente ao coletor

ACN=Acetonitrila

AcOEt=Acetato de etila

AEEC=Cepa de *Escherichia coli* Attaching and effaching

Amo=Amoxicilina

Amp=Ampicilina

APEC=Cepa de *Escherichia coli* patogênica de aves

ATCC=Cepa de *Escherichia coli* padronizada pela American Type Culture Collection

BuOH=Butanol

C=Concentração celular final

CBM=Concentração bactericida mínima

CC=Cromatografia em coluna

CCD=Cromatografia em camada delgada

CDCl<sub>3</sub>=Clorofórmio delterado

Cef=Cefalexina

CGen=Conselho de gestão do patrimônio genético

CHCl<sub>3</sub>=Clorofórmio

CIM=Concentração inibitória mínima

CLAE=Cromatografia líquida de alta eficiência

CNF1=Toxina necrosante

CNF2=Toxina necrosante

C<sub>0</sub>=Concentração celular inicial

DCM=Diclorometano

DDA=Disco difusão em agar

DOXO=Doxorrubicina

DSMO=Dimetilsulfoxo

*E. coli*=*Escherichia coli*

EB=Extrato bruto

EPEC=*Escherichia coli* enteropatogênica

EUCAST=Europen Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

EXPEC=*Escherichia coli* extrapatogênica

Fluor=Fluorquinolona

H=Flagelares

H=Hidrogênio

$H_2O$ =Água

$H_2SO_4$ =Ácido sulfúrico

$H_2PO_4$ =Ácido fosfórico

Hex=Hexano

Hz=Hertz

IBAMA=Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IC=Porcentagem de inibição

$J$ =Constante de acoplamento

K=Capsular

Kg=Kilograma

L=Litro

LC-MS=Cromatografia de alta eficiência à espectrometria de massas

M=Massa

$m/z$ =Massa/carga

MCF-7=Adenocarcinoma de mama

MDC=Microdiluição em caldo

MeOH=Metanol

mg=Miligrama

mL=Mililitro

MMA=Ministério do Meio Ambiente

$NH_4OH$ =Hidróxido de amônio

nm=Nanômetro

O=Lipopolissacarídeo

PC-3=Adenocarcinoma de próstata

PSC=Sigla referente ao coletor

RMN=Ressonância magnética nuclear

RMNC=Ressonância magnética nuclear de carbono

RMNH=Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SEPEC=*Escherichia coli* septicêmica

SRB=Sulfo-rodamina B

STEC=*Escherichia coli* produtora de toxina Shiga

Sulfa=Sulfametoxazol

T=Valores de transmitância final

Tet=Tetraciclina

TFA=Trifluoracético

T<sub>0</sub>=Valores de transmitância inicial

Trim=Trimetroprim

UFC=Unidade formadora de Colônia

UPEC=*Escherichia coli* uropatogênica

UV=Ultravioleta

v/v=Volume/volume

VETC= *Escherichia coli* verotoxigênica

VT=Verotoxina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 LITERATURA CONSULTADA</b>	2
<b>2.1 Resistência bacteriana</b>	2
<b>2.2 <i>Escherichia coli</i></b>	3
2.2.1 Causadoras de doenças entéricas	4
2.2.2 Causadoras de doenças extra-intestinais (ExPEC)	5
2.2.3 Doenças veterinárias e o patógeno <i>Escherichia coli</i>	6
2.2.3.1 Colibacilose em animais de produção e equinos	6
2.2.3.2 Colibacilose aviária	7
2.2.3.3 Cisteite e piometra em animais de companhia	8
2.2.3.4 Colibacilose em aves silvestres	9
<b>2.3 Prejuízos econômicos causados pela <i>Escherichia coli</i></b>	9
<b>2.4 Antimicrobianos</b>	10
<b>2.5 Biodiversidade brasileira</b>	11
2.5.1 <i>Microplumeria anomala</i>	13
2.5.2 <i>Buchenavia oxycarpa</i>	14
<b>3. OBJETIVO</b>	16
<b>3.1 Objetivo geral</b>	16
<b>3.2 Objetivo específico</b>	16
<b>4. MATERIAL E MÉTODO</b>	17
<b>4.1 Material Vegetal</b>	17
4.1.1 Coleta do material vegetal	17
4.1.2 Obtenção do extrato vegetal	17
4.1.3 Preparo das amostras para os ensaios biológicos	18
<b>4.2 Análise química dos extratos</b>	19

4.2.1 Fracionamento dos extratos	19
4.2.2 Técnicas cromatográficas empregadas no fracionamento	21
4.2.2.1 Cromatografia em camada delgada analítica e preparativa	21
4.2.2.2 Cromatografia em coluna	22
4.2.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	23
4.2.3 Ensaios espectroscópicos empregados na identificação de substâncias	24
4.2.3.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM)	24
4.2.3.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono	24
4.2.4 Extração de alcaloides	24
4.2.4.1 A partir da planta	24
4.2.4.1.1 Método em meio alcalino (AT2267)	24
4.2.4.1.2 Método em meio ácido (AT2268)	26
4.2.4.2 A partir do extrato bruto	28
4.2.4.2.1 Método em meio ácido	28
4.3 Análise biológica	30
4.3.1 Ensaio antimicrobiano	30
4.3.1.1 Cepas bacterianas utilizadas	30
4.3.1.2 Ensaio da disco difusão em agar	31
4.3.1.3 Delineamento experimental	32
4.3.1.4 Análise estatística	32
4.3.1.5 Ensaio da microdiluição em caldo	32
4.3.2 Avaliação da citotoxicidade	33
<b>5 RESULTADOS</b>	36
5.1 <i>Microplumeria anomala</i>	36
5.1.1 Resultados botânicos	36
5.1.2 Resultados da análise química das frações de EB127	36

5.1.3 Resultados da análise química das frações de alcaloides totais de <i>Microplumeria anomala</i>	78
5.1.3.1 Alcaloides totais obtidos pelo meio alcalino a partir da planta (AT2267)	78
5.1.3.2 Alcaloides totais obtidos pelo meio ácido a partir da planta (AT2268)	79
5.1.3.3 Alcaloides totais obtidos pelo meio ácido a partir do EB127	79
5.1.4 Resultados da análise biológica	82
5.1.4.1 Resultados da análise antimicrobiana	82
5.1.4.1.1 Resultados da análise antimicrobiana por meio da disco difusão em ágar	82
5.1.4.1.2 Resultados da análise antimicrobiana por meio da microdiluição em caldo	87
5.1.4.2 Resultados da análise citotóxica	88
5.2 <i>Buchenavia oxycarpa</i>	89
5.2.1 Resultados botânicos	89
5.2.2 Resultados da análise química	90
5.2.2.1 Resultados da análise química das frações de EB725	90
5.2.2.2 Alcaloides totais obtidos pelo meio ácido a partir do EB725	91
5.2.3 Resultados da análise biológica	92
5.2.3.1 Resultados da análise antimicrobiana	92
5.2.3.1.1 Resultados da análise antimicrobiana por meio da disco difusão em agar	92
5.2.3.1.2 Resultados da análise antimicrobiana por meio da microdiluição em caldo	94
5.2.3.2 Resultados da análise citotóxica	94
6 DISCUSSÃO	95
6.1 <i>Microplumeria anomala</i>	95
6.2 <i>Buchenavia oxycarpa</i>	101

<b>7 CONCLUSÃO</b>	103
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	104
<b>ANEXOS 1</b>	118
<b>ANEXOS 2</b>	128

## 1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana é um dos maiores problemas de saúde pública do século XXI. O sistema de produção animal pode ter uma ligação direta com esse fato, pois a utilização indiscriminada e contínua dos antibióticos em granjas pode ter gerado consequências negativas para os consumidores e indiretas ao resto da população.

A utilização de antibióticos como promotores de crescimento nas granjas foi uma prática adotada na década de 1950 que é, atualmente, banida em diversos países, por conta de promover a seleção de cepas mais resistentes e por gerar a presença de fase de partição na carne e no leite. Por esses motivos, os produtores continuam enfrentando o aparecimento de cepas cada vez mais resistentes, causando prejuízos econômicos devastadores.

A bactéria *Escherichia coli* está envolvida em diversas condições patológicas importantes em Medicina Veterinária. Esse micro-organismo pode causar doenças que impedem o desenvolvimento adequado de animais de produção, causando prejuízos econômicos, e é um dos principais agentes patológicos de animais de companhia.

A necessidade de se introduzir novos fármacos antimicrobianos que sejam seguros para animais de companhia e para animais de produção é grande, e produtos naturais aparecem como uma fonte promissora de novos medicamentos.

A natureza é uma fonte potencial de novos fármacos antibacterianos, e suporta a busca por novas moléculas precursoras que apresentem a atividade farmacológica sem apresentar os efeitos indesejados nos produtos pecuários. O Brasil é o país que apresenta a maior biodiversidade terrestre, e a riqueza de espécies vegetais de suas florestas fornece uma fonte significativa de moléculas a serem estudadas quanto ao potencial farmacológico.

Foi realizada uma triagem biológica com 1.791 extratos vegetais obtidos de espécies coletadas na floresta Amazônia e da Mata Atlântica. Na triagem, os extratos foram testados contra *E. coli*. Dentre esses, destacaram-se dois obtidos das espécies *Microplumeria anomala* e *Buchenavia oxycarpa*, que foram matéria do presente estudo.

## 2 LITERATURA CONSULTADA

### 2.1 Resistência bacteriana

Em pleno o século XXI, a resistência microbiana tem sido foco de estudos, pois afeta diretamente a saúde pública. As bactérias vêm apresentando uma crescente resistência a medicamentos, devido ao uso incorreto e banalizado dos antibióticos, o que as torna mais virulentas, causando preocupação mundial (WANNMACHER, 2004). Novos patógenos resistentes têm sido descobertos, e tem gerado enfermidades preocupantes com impacto na saúde pública (GRECO, 2009).

De acordo com Markey, Carter, Donnelly et al., (2005) os principais fatores causadores de resistência bacteriana são:

- Uso excessivo de um determinado fármaco na tentativa de curar enfermidades diferentes;
- Não respeitar a posologia descrita, alterando tempo de administração do medicamento, quantidade administrada, cumprimento do horário com rigor, causando consequentemente a seleção das bactérias que se tornaram mais resistentes frente ao antibiótico escolhido;
- Troca de material genético entre bactérias resistentes;
- Micro-organismos possuidores de plasmídios e transposons se tornam mais resistentes às diferentes classes de medicamentos;
- Produção de enzimas bacterianas que são capazes de inativar ou destruir o antibiótico;
- Determinados patógenos desenvolvem caminhos metabólicos alternativos para substituir antígenos já inativados pelo fármaco.

Outro fator preocupante, em especial na agropecuária, é a utilização indiscriminada dos antimicrobianos como promotores de crescimento. Tal prática passou a ser realizada desde a década de 1950 com o conceito de que a utilização de aditivos alimentares, como os antibióticos, auxiliaria o criador a gerar maior lucro com o desempenho eficiente dos animais. Atualmente, a União Europeia proíbe essa

prática devido ao risco de se desenvolver maior resistência antimicrobiana e para se evitar a presença de resíduos na carne e no leite. Como alternativa, os prebióticos, probióticos e extratos vegetais vêm sendo opções que trariam resultados satisfatórios no desenvolvimento e ganho de peso dos animais de produção. Os prebióticos agem como carboidratos fermentáveis capazes de promover um estímulo de crescimento e equilíbrio da microbiota intestinal. Os probióticos são os micro-organismos vivos, não patogênicos, que mantêm o controle do crescimento de bactérias oportunistas, além de estimular a modulação do sistema imune (SANTOS; FIALHO; ZANGERÔNIMO et al., 2016). Diversos extratos vegetais vêm sendo testados por criadores, e um deles é o extrato de alho em pó, que vem sendo utilizado em granjas de frangos como aditivo na ração. Tal extrato tem mostrado atividade antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antiviral e antiparasitária e tem proporcionado aos animais melhora do sistema imune e, consequentemente, no desempenho (DALOLIO; MOREIRA; VALADARES et al., 2015).

Dentre os micro-organismos que são importantes na geração de resistência aos antibióticos destaca-se a bactéria *Escherichia coli*, causadora de enfermidades, particularmente em animais de produção, trazendo prejuízos econômicos e preocupação à saúde pública (GONÇALVES; LIMA; SEQUEIRA et al., 2007).

## **2.2 *Escherichia coli***

*E. coli* é uma bactéria Gram negativa que possui a forma de bastonete curto, pode ser móvel ou imóvel, é anaeróbia facultativa, não produz esporos. Tem como seu habitat natural o trato intestinal da maioria dos animais homeotérmicos e por esse motivo é encontrada nos dejetos fecais (PASTORE, 2014).

Por meio do processo evolutivo, algumas cepas passaram a adquirir novos genes de virulência capazes de ocasionar enfermidades. As cepas podem ser diferenciadas de acordo com a sorotipagem, o que permite diferenciar as comensais das patogênicas. Tal técnica é realizada por meio da soroaglutinação, que permite identificar os抗ígenos presentes na superfície bacteriana. Esses抗ígenos são de natureza lipopolissacarídeos (O), flagelares (H) e capsulares (K). A combinação dos

antígenos O e H permite definir o sorotipo das cepas (TRABULSI; CAMPOS, 2002). A função desses抗ígenos é determinada pelas cadeias de carboidratos, com exceção do flagelo que é proteico (MARKEY; CARTER; DONNELLY et al., 2005).

Esse micro-organismo possui cepas saprófitas que são de baixa virulência, porém existem *E. coli* diarreogênicas e patogênicas extraintestinais que são altamente virulentas e podem levar o indivíduo afetado a óbito.

### 2.2.1 Causadoras de doenças entéricas

- *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC): acometem principalmente animais recém-nascidos (bovinos e suínos). São capazes de aderir superficialmente sobre as células da mucosa intestinal sem provocar danos às microvilosidades, consequentemente os pacientes afetados apresentam diarreia aquosa, sem a presença de sangue, leucócitos e muco (MARKEY; CARTER; DONNELLY et al., 2005).
- *Attaching and effecing E.coli* (AEEC): nas áreas rurais acometem principalmente os bovinos, suínos, ovinos e coelhos. Essa cepa pode ocasionar sérios prejuízos ao produtor, já que provoca diarreia aquosa a sanguinolenta, uma vez que a bactéria destroi os enterócitos e leva ao arrasamento das microvilosidades. A cepa de *Enteropathogenic E. coli* (EPEC) faz parte desse grande grupo capaz de destruir os enterócitos e suas colônias que se instalaram na superfície da mucosa intestinal, impedem a regeneração das vilosidades, o que compromete a absorção de nutrientes (CARVALHO; GYLES; ZIEBELL et al., 2003). Tal cepa acomete principalmente humanos, mas também já foi descrito em cordeiros, leitões e ninhadas de cães (MARKEY; CARTER; DONNELLY et al., 2005).
- *Shiga toxin-producing E. coli* (STEC): os animais mais acometidos são os pequenos ruminantes, suínos e bovinos. O animal, além de apresentar diarreia, que pode variar de aquosa a sanguinolenta, também pode desenvolver alterações neurológicas, anemias e colites hemorrágicas. A cepa *Enterohemorrhagic E. coli* pertence a um subgrupo que, além de produtor dessa toxina, apresenta outros fatores

de virulência capazes de evoluir para síndrome hemolítica urêmica e falência renal (VAZ, 2014).

- *E. coli* verotoxigênica (VTEC): produzem verotoxinas como VT1 e VT2, causadoras de lesões vasculares. Afetam mais os suínos, mas podem provocar problemas hemorrágicos em bezerros (MARKEY; CARTER; DONNELLY et al., 2005).
- *E. coli* necrotoxigênica: liberam toxinas necrosantes como CNF1 e CNF2 os quais lesionam enterócitos e a parede vascular (MARKEY; CARTER; DONNELLY et al., 2005).

#### 2.2.2 Causadoras de doenças extraintestinais (ExPEC)

Nesse caso, a bactéria invade outros órgãos, sendo considerada oportunista. Diferente das cepas diarreogênicas, não apresentam fatores de virulência específicos, podendo afetar qualquer órgão de todas as espécies. A suscetibilidade dos animais a essas cepas varia conforme seu estado nutricional, imunidade individual, idade e exposição e quanto à quantidade de *E. coli* patogênicas (MARKEY; CARTER; DONNELLY et al., 2005).

- *Uropathogenic E. coli* (UPEC): essa cepa é encontrada com frequência em cadelas, gatas e humanos. Dependendo dos genes de virulência, podem formar colônias bacterianas nas paredes da bexiga, nos rins e até no útero, sendo o principal agente a causar cistites e piometras nas cadelas e gatas (VON SYDOW; COOGAN; MORENO et al., 2006).
- *Septicemic E. coli* (SEPEC): as cepas bacterianas desse grupo têm o potencial de invadir a circulação sanguínea e de liberar toxinas que se disseminam por todo o corpo do indivíduo. Geralmente são consideradas causadoras de infecções secundárias e podem acometer qualquer espécie, principalmente indivíduos imunossuprimidos (TOMAZETTO; SILVA; VIDOTTO, 2004).
- *Avian pathogenic E. coli* (APEC): acometem principalmente granjas aviárias, e causam grandes prejuízos econômicos ao criador, uma vez que as aves acometidas podem apresentar desde problemas respiratórios como a aerosaculite e

pneumonia, até alterações do aparelho reprodutor com a redução de postura, salpingite e morte embrionária (MACHADO; NASCIMNETO; PEREIRA et al., 2013).

Os diferentes sorotipos são responsáveis por uma variedade de doenças que trazem grandes complicações para os animais domésticos, de produção e seus proprietários. As mais frequentemente diagnosticadas em clínicas veterinárias serão citadas a seguir.

### 2.2.3 Doenças veterinárias e o patógeno *Escherichia coli*

#### 2.2.3.1 Colibacilose em animais de produção e equinos

- A colibacilose acomete bezerros, leitões, cordeiros, cabritos e potros. É uma doença causada por *E. coli* (ETEC), porém pode variar de linhagens patogênicas, acometendo todas as espécies de animais de produção recém-nascidos, causando diarreia, desidratação e choque. Se não for tratada logo, pode levar o animal a óbito em poucos dias (COURO; LAGES; HEINEMANN, 2014).
- A mastite ambiental é um processo infeccioso que pode ser causado por *E. coli* também encontrada no meio ambiente, principalmente em serragens e maravalhas, utilizadas para fazer a cama do gado. A contaminação ocorre pelo contato da parte distal dos tetos com o ambiente repleto de patógenos. Por esse motivo, bovinos confinados em estábulos apresentam altas taxas de infecção por *E. coli*, em comparação com os animais soltos no pasto. Normalmente, o processo infeccioso acomete vacas entre o sétimo e o décimo dia antes de parir. O animal apresentará o úbere edemaciado, hipertermia local, endurecimento das glândulas mamárias, aumento da frequência cardíaca e respiratória, febre e abscessos intramamários. O leite coletado desse animal apresenta uma coloração amarelada e com a presença de grumos. Em achados necróticos, foram encontradas glândulas mamárias edemaciadas, com lesões, pontos hemorrágicos e áreas necrosadas no parênquima glandular (RODOSTITS; GAY; BLOOD et al., 2000).

### 2.2.3.2 Colibacilose aviária

- A colibacilose em aves, provocadas por APEC, normalmente é sistêmica e vem associada a enfermidades primárias. É considerada uma doença devastadora para a avicultura industrial. Os fatores predisponentes são a superpopulação, a falta de ventilação, eventuais falhas nos processos de desinfecção, elevadas concentrações de amônia, umidade nas camas de frango e variações bruscas de temperatura. Dentre os sinais clínicos, geralmente não causa diarreia, como ocorre em outras espécies, o que pode retardar o diagnóstico. Essa enfermidade afeta principalmente o aparelho respiratório e reprodutor das aves em diferentes fases da vida. Aves jovens, de quatro a nove semanas de vida, são mais predispostas a apresentarem problemas respiratórios, como dispneia, aerossaculite, pneumonia, pericardite e periepatite (condenação da carcaça). Já em aves adultas ocorre uma predisposição a salpingites. A doença pode evoluir para uma septicemia, mais frequente nas aves jovens, uma vez que tem como porta de entrada o trato respiratório superior, e as bactérias irão se instalar na traqueia, provocar irritação do epitélio respiratório e estimular a produção de muco e favorecer a multiplicação e disseminação pela corrente sanguínea, podendo eventualmente levar o animal a óbito (MACHADO; NASCIMENTO; PEREIRA et al., 2013).

- Salpingite: acomete aves adultas gerando problemas no trato reprodutivo. A infecção do oviduto se dá pela sua proximidade com os sacos aéreos ou por infecções ascendentes originárias da cloaca. O oviduto se encontrará preenchido por massas caseosas, causando aumento de volume, os folículos ovarianos sofrerão degeneração e se tornar-se-ão flácidos. Nesse caso, o folículo pode cair na cavidade peritoneal e ocasionar uma peritonite fibrinosa, levando à mortalidade aguda. Após seis meses da infecção, a maioria das aves vem a óbito, e caso sobrevivam, dificilmente voltarão a fazer postura (FERREIRA; REVOLLEDO, 2009).

- Dermatoses: as dermatoses causadas pela APEC estão associadas às altas densidades populacionais, umidade da cama de frango, dermatites de contato e manejo das aves. Os machos são os mais acometidos por conta do empenamento lento e da agressividade, gerando lesões cutâneas por traumatismos. As aves enfermas ficam prostradas e permanecem deitadas sobre a cama de frango,

permitindo que outras aves as pisoteiem, podendo provocar lesões cutâneas por arranhões. Tais lesões infecionam e formam abcessos, que podem levar a ave a óbito por septicemia. Nesses casos, ocorre condenação parcial ou total da carcaça (SILVA, 2016).

#### 2.2.3.3 Cistite e piometra em animais domésticos

- A cistite é um processo inflamatório da vesícula urinária, diagnosticado em clínicas veterinárias. A bactéria *E. coli* é o principal agente causador dessa enfermidade. As fêmeas são mais suscetíveis por possuírem a uretra mais curta em relação aos machos, o que diminui as barreiras de defesa contra patógenos ascendentes. O trato urinário inferior é estéril, com exceção da região distal da uretra, devido à micção constante e a propriedade de defesa urinária, tais como acidez da urina de carnívoros e da produção de mucina (impedem a aderência bacteriana), presença de imunoglobulina A, elevada osmolaridade da urina e altas concentrações de sais orgânicos e ureia. A colonização das bactérias na bexiga ocorre quando conseguem driblar os mecanismos de defesa ou por retenção urinária, então se fixam na mucosa através de fímbrias que facilitam a adesão. Em indivíduos diabéticos, o crescimento bacteriano é facilitado por conta da produção da urina glicosilada. A cistite causa o espessamento da parede da bexiga, erosões e ulcerações na mucosa, aderência de detritos necróticos ou coágulos de sangue e as hemorragias aparecem em casos de obstrução da uretra. A urina se apresentará com aspecto turvo, com presença de flocos, odor desagradável e normalmente com coloração avermelhada (VON SYDOW; COOGAN; MORENO et al., 2006).

- A piometra é uma doença que acomete cadelas e gatas e está associada a infecções secundárias à hiperplasia do endométrio, e ocorre em fases de pseudogestação. Caracteriza-se pela distensão uterina, cujas mucosas podem ser encontradas ulceradas, com focos necróticos, pontos hemorrágicos e presença de exudato, cuja coloração e consistência podem variar de acordo com o tipo de bactéria que está colonizando a região. Caso a enfermidade não seja tratada logo, o animal poderá vir a óbito por septicemia (CARLTON; MCGAVIN, 1998).

#### 2.2.3.4 Colibacilose em aves silvestres

- Segundo Knöbl, Godoy, Matushima et al., (2008), em achados de necropsia, *E. coli* é o patógeno isolado encontrado com maior frequência em tecidos de aves silvestres. As aves susceptíveis à colibacilose são aquelas que sofreram algum tipo de estresse como transporte, nutrição inadequada e erros de manejo, podendo levar o animal a apresentar imunossupressão e a desenvolver a doença. Os sinais clínicos mais aparentes são penas arrepiadas, letargia, anorexia, inflamação dos sacos aéreos, inflamação intestinal, hepatite e comprometimento de outros órgãos como rins, pulmões, articulações e oviduto. Em filhotes, provenientes de tráfico, por serem mais frágeis, geralmente apresentam morte súbita devido à colisepticemia, porém em casos de sobrevivência, a ave pode apresentar atraso do crescimento, onfalite ou desidratação. A gravidade varia conforme o fator de virulência da bactéria (CUBAS; SILVA; DIAS, 2007).

### 2.3 Prejuízos econômicos causados pela *E. coli*

Em relação às referidas enfermidades nesse estudo, é possível fazer-se analogias entre os problemas financeiros decorrentes das doenças causadas por *E. coli* e o impacto na saúde pública.

*E. coli*, além de afetar a homeostasia dos animais com o aparecimento de sinais clínicos correspondentes a cada enfermidade, pode causar prejuízos econômicos irreparáveis aos criadores de animais de produção (CAMARGO; SUFFREDINI, 2015).

As doenças entéricas como a colibacilose em bezerros trazem prejuízos econômicos para a pecuária bovina de corte, levando a aproximadamente 2% de mortalidade dos animais. A raça Nelore é a mais afetada por essa enfermidade, e os danos financeiros causam impacto na produção em diversos Estados do Brasil (FILHO; SILVA; PACHECO et al., 2007). Os animais voltados para corte como bovinos, suíños, caprinos, ovinos e aves são considerados reservatórios da bactéria

que, ao serem consumidos, podem desencadear problemas de saúde pública devido à gravidade da doença e altas taxas de indivíduos infectados por esse patógeno. *E. coli* já desencadeou surtos de doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados, como carne e laticínios ocorridos no Reino Unido e hambúrgueres de carne bovina nos Estados Unidos (BORATTO; LOPES; OLIVEIRA et al., 2004).

O rebanho leiteiro, acometido por *E. coli*, traz menor rentabilidade ao criador devido à queda produtiva de leite, tratamentos de alto custo e desvalorização dos laticínios. As indústrias também são afetadas economicamente pelas dificuldades que enfrentam no processamento dos laticínios e na queda do rendimento, em decorrência da baixa qualidade do leite (LOPES; LACERDA; RONDA, et al., 2013).

A colibacilose e a salpingite comprometem comercialmente a avicultura em nível nacional. As aves acometidas sofrem perda de peso, promovendo baixa conversão alimentar, perda de matrizes, levando à diminuição na postura de ovos, alta mortalidade provocada pela efetiva disseminação da doença e tratamentos caros (BARBIERI, 2010).

Quando se trata de pequenos animais domésticos e silvestres, os custos com o serviço veterinário e com as medicações recomendadas são altos, além de causar em muitos casos, abalos emocionais aos proprietários.

A partir dos fatos expostos, nota-se a importância de se introduzir novos antibióticos na terapêutica veterinária, com vistas a minimizar ou evitar os transtornos e danos irreversíveis causados por essa bactéria, e que podem causar impactos econômicos negativos na ordem de milhões de dólares.

## 2.4 Antimicrobianos

Segundo Calixto (2003), um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foi desenvolvido a partir de substâncias naturais, obtidos de micro-organismo, animais e vegetais. No caso de drogas anticancerígenas e de antibióticos, por exemplo, esse percentual atinge cerca de 70%.

Newman e Cragg (2014) realizaram um levantamento de todos os medicamentos inseridos no mercado entre os anos de 1981 a 2014, dentre os quais os antimicrobianos atingiram o total de 140, e 11 eram de origem natural inalterado, 71 derivados de produtos naturais, uma macromolécula biológica, 29 sintética, uma sintética (farmacóforo)/inspirados em produtos naturais e 27 vacinas.

A vancomicina é um antibiótico que foi descoberto em 1956, pela farmacêutica Eli Lilly, sendo produzido por meio do isolamento da fermentação de bactérias *Streptomyces orientalis*. Esse antibiótico tem ação ativa contra bactérias Gram positivas e atua na inibição da síntese da parede celular bacteriana (LEVINE, 2006).

A penicilina foi descoberta acidentalmente em 1929, por Alexander Fleming, observando em uma placa de cultura de *Staphylococcus*, o crescimento de um fungo, o *Penicillium notatum*, que impedia o desenvolvimento das bactérias. A penicilina foi purificada somente em 1940. Com a realização de novos testes clínicos do antibiótico, começou a ser produzidos por indústrias farmacêuticas (MARKEY; CARTER; DONNELLY et al., 2005).

## 2.5 Biodiversidade brasileira

O Brasil é considerado o país que detém a maior biodiversidade do planeta. Nele, há a presença de 20% da totalidade de espécies terrestres, segundo dados da *Conservation International* (AZEVEDO, 2003). A Floresta Amazônica e a Mata Atlântica representam 30% das florestas tropicais do mundo, abrangendo a maior biodiversidade dentre qualquer floresta do planeta (CUNHA; NETO; SUFFREDINI, 2014). Dentro desse vasto acervo biológico, existem milhares de espécies de plantas ainda a serem estudadas quanto ao seu potencial farmacológico, químico e toxicológico, visando à obtenção de novos antibióticos de fontes naturais, o que desperta o interesse da comunidade científica, numa perspectiva de produzir-se novos fármacos.

Para que os pesquisadores tenham acesso à mata nativa brasileira, é necessário obter-se uma autorização dos órgãos públicos. O decreto Nº 2519/1998

foi elaborado a partir de diretrizes estipuladas na “*Convenção Sobre a Diversidade Biológica*”, ocorrida no Rio de Janeiro em 1992, e tem como foco principal estabelecer estratégias para a conservação da biodiversidade, para seu uso sustentável e para a repartição dos benefícios encontrados a partir da identificação de recursos potencialmente explorados economicamente.

Apesar das dificuldades observadas para obter-se o acesso aos recursos genéticos brasileiros, alguns grupos de pesquisa obtiveram as licenças necessárias e iniciaram programas de triagens de extratos vegetais originados da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica que apresentassem atividade biológica, com o intuito de encontrar princípios ativos com potencial bactericida/bacteriostático para a produção de novos antibióticos (SUFFREDINI, SADER, GONÇALVES et al., 2003).

Alguns povos antigos, tais como os egípcios, indianos e chineses, já faziam uso de produtos naturais, e essa tradição permanece até hoje, em países cujo acesso a medicamentos industrializados é mais restrito, ou em países que possuem comunidades tradicionais indígenas ou tribais.

As plantas apresentam diferentes formas de defesa contra o ataque de micro-organismos, insetos e herbívoros e diferentes formas de atrair animais polinizadores, além de desenvolver ferramentas que as plantas adaptavam às condições ambientais adversas. Um dos tipos de ferramentas desenvolvidos pelas plantas como defesa e atração são os metabólitos secundários. Tais compostos são obtidos através de vias metabólicas adjacentes às rotas de biossíntese de proteínas, açúcares e gorduras. Na literatura, descreve-se a existência de aproximadamente 50.000 desses metabólitos identificados em angiospermas, porém, em muitos deles seu potencial farmacológico é desconhecido (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Alguns extratos de plantas possuem compostos com atividade antibacteriana, tais como alcaloides, flavonoides, taninos, quinonas, compostos sulforados, entre outros (SCHUCH; Wiest; COIMBRA et al., 2007). Os flavonoides derivam de compostos fenólicos e encontram-se em maiores concentrações em frutas cítricas (CARVALHO; LACERDA; OLIVEIRA et al., 2000). São produzidos pelas plantas para que se protejam dos raios solares (UVA e UVB), agem como antioxidantes naturais, para comporem a coloração das partes aéreas envolvidas no processo de polinização, além de ação antimicrobiana (NETO; LOPES, 2007).

Os alcaloides são compostos secundários obtidos por várias vias metabólicas. São compostos orgânicos heterocíclicos, que apresentam nitrogênio em sua estrutura, caráter alcalino e são farmacologicamente ativos (HENRIQUES; KERBER; MORENO, 1999). De modo geral, os alcaloides apresentam diversas atividades farmacológicas, como agentes antitumorais, antimicrobianos, agentes ativos sobre funções digestivas, agentes depressores ou estimulantes do sistema nervoso central, agentes ativos sobre o sistema nervoso autônomo, entre outras. Por isso, podem apresentar uma variedade de mecanismos de ação, inclusive os que estão ligados à ação antifúngica, inibidores de nematoides e antibacterianos (MARINHO, 2001).

As quinonas são originadas da oxidação de fenóis e apresentam propriedades antimicrobianas, inseticidas e têm sido utilizadas como corantes, por diversos povos (CARVALHO; LACERDA; OLIVEIRA et al., 2000 ).

Os compostos sulfurados são provenientes de aminoácidos como a cisteína, e são capazes de inativar bactéria, fungos, nematoides e insetos (CARVALHO; LACERDA; OLIVEIRA et al., 2000 ).

Os taninos são derivados fenólicos, com propriedades de precipitarem proteínas, alcaloides e outras macromoléculas, além de quelarem metais, atuam como bactericidas, anti-helminticos e antitumorais (CARVALHO; LACERDA; OLIVEIRA et al., 2000 ).

#### 2.5.1 *Microplumeria anomala*

*Microplumeria anomala* (Müll. Arg.) Makgr. é uma das espécies trabalhadas neste estudo, da qual se obteve o extrato orgânico bruto denominado EB127. A espécie pertence à família Apocynaceae e apresenta como sinonímia científica *Aspidosperma anomalam* (Müll. Arg.), ou *Cylindrosperma anomalam* (Müll. Arg.) Ducke, ou ainda *Microplumeria sprucei* Baill. É uma espécie nativa do Brasil, embora não endêmica. Ocorre apenas no Norte do Brasil, nos estados do Amazonas e do Pará. Pode ser encontrada nos seguintes domínios fitogeográficos: Amazônia. Tipo de vegetação da floresta do Igapó (*Microplumeria* in FLORA DO BRASIL 2020).

Poucos estudos foram feitos com espécies de *Microplumeria*, incluindo a espécie *M. anomala*, considerados suas sinônimas científicas. Reis Luz, da Rocha, Porter et al. (1983) isolaram quatro alcaloides do caule de *M. anomala*, como aspidoscarpina, anomalina, dimetoxianomalina e 12-O-metilanomalina (figura 1 do anexo 1). Segundo pesquisas realizadas por Cordell (1998), amostras de *M. anomala* coletada às margens do Rio Negro, demonstraram a presença de alcaloides indólicos, extraídos da casca, como anomalina, 12-O-metilanomalina e dimetoxilanomalina. A atividade antibacteriana de *M. anomala* foi reportada anteriormente (CAMARGO, SUFFREDINI, 2014); (SUFFREDINI; BACCHI; SAKUDA et al., 2002). Estudos químicos foram realizados e detectaram a presença de glicosídeos, triterpenos e alcaloides (PINTO; FERREIRA, 2012); (SUFFREDINI; BACCHI; SAKUDA et al., 2002); (OLIVEIRA; FREITAS; MATHIAS et al., 2009).

## 2.5.2 *Buchenavia oxycarpa*

*Buchenavia oxycarpa* (Mart.) Eichler, representada neste estudo pelo extrato orgânico bruto EB725, pertencente à família Combretaceae, apresenta as sinônimas científicas *Terminalia oxycarpa* Mart., *Buchenavia punctata* Eichler, não é considerada uma espécie endêmica. Pode ser encontrada no Norte (Acre, Amazonas, Pará, Roraima e Rondônia), Nordeste (Ceará e Piauí) e Centro-Oeste (Mato grosso) (*Buchenavia* in FLORA DO BRASIL , 2020). Popularmente, é conhecida por periquiteira-do-igapó, lagatillo negro e yacushapana e tanimbuca, sendo este último dado a várias espécies do mesmo gênero (REVILLA, 2002). Pode ser encontrada nos seguintes domínios fitogeográficos: Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica, tipo de vegetação do Cerrado, Floresta de Terra Firme e Floresta Estacional Semideciduval ( *Buchenavia* in FLORA DO BRASIL, 2020).

Essa família é formada por 52 gêneros, sendo 20 subtropicais (RIBEIRO; HOPKINS; VICENTINI et al., 1999), e 475 espécies. No Brasil, são encontrados cinco gêneros e 63 espécies. Diante dessa variabilidade de gêneros e espécies espalhadas pelo mundo, tem-se descrito na literatura a utilização de plantas dessa família por diversas culturas. Curandeiros africanos fazem uso de espécies dos gêneros

*Combretum* e *Terminalia* para o tratamento várias enfermidades, como dores nas costas, febre, lepra, gengivites, cáries, pneumonias, tuberculose, gonorreia, sífilis, desordens gastrointestinais, hipertensão, parasitoses e alguns tipos de cânceres (TEODORO, 2011).

O gênero *Buchenavia* tem sido estudado, como em *B. capitata*, da qual foram isolados de suas folhas compostos como alcaloides e flavonoides, capazes de apresentar moderada ação anti-HIV, porém com alta toxicidade. Já da espécie *B. parviflora* foram isolados compostos que apresentavam ação contra a enzima ácido graxo sintase (promove a biossíntese de lipídeos de células eucarióticas, porém incapaz de promover ação antifúngica) de suas raízes (TEODORO, 2011).

*Buchenavia oxycarpa* ainda é pouco estudada, e segundo a literatura consultada, apresenta compostos capazes de aumentar a durabilidade natural da madeira, demonstrando resistência a cupins *Nasutitermes* sp. (BARBOSA; NASCIMENTO; MORAIS, 2007).

O presente estudo visa à verificação da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais de *Microplumeria anomala* e *Buchenavia oxycarpa* contra *Escherichia coli* e à identificação compostos ativos a fim de que novos medicamentos venham, em um futuro próximo, ser desenvolvidos e utilizados no controle das doenças de importância em Medicina Veterinária.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo geral**

O presente estudo visa à avaliação da atividade biológica e ao estudo fitoquímico dos extratos vegetais de *Microplumeria anomala* e *Buchenavia oxycarpa* contra cepas de *Escherichia coli*.

### **3.2 Objetivo específico**

- Avaliação antimicrobiana dos extratos brutos e suas frações contra quatro cepas de *Escherichia coli*;
- Avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos e da fração de alcaloides totais em células cancerígenas humanas de mama e próstata.
- Isolamento dos compostos;
- Identificação de compostos ativos contra cepa de *Escherichia coli*.

## **4. MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1 Material Vegetal**

#### 4.1.1 Coleta do material vegetal

A coleta de material botânico foi feita na região Amazônica e na Mata Atlântica, sob licenças de coleta junto ao ICMBio de número nº 14895-6 e de acesso a recursos genéticos do IBAMA/CGen/MMA nº 2008/12A. Nenhum trabalho de coleta foi realizado sem que houvesse as autorizações pertinentes do IBAMA/CGen/MMA emitidas. As coletas foram feitas no Parque Nacional de Anavilhanas (antigamente classificado como Estação Ecológica de Anavilhanas). Foram coletados o caule de *Microplumeria anomala* e os frutos de *Buchenavia oxycarpa*. *B. oxycarpa* encontra-se localizada em 2°59' de latitude e 60°26' de longitude.

#### 4.1.2 Obtenção do extrato vegetal

Ambos os materiais vegetais foram coletados e transportados ao laboratório em sacos de algodão, com a devida identificação. Depois, os materiais foram secos em estufa de circulação de ar a 40 °C, sendo em seguida moídos em moinho de martelo (Holmes). Com o material moído, foi realizada maceração utilizando a mistura de solventes composta por metanol e diclorometano (1:1) (Synth), por 24 h (figura 1). Os extratos orgânicos foram evaporados à pressão reduzida (Buchii), antes de serem estocados a -27 °C (Revco), até serem utilizados nos experimentos (YOUNES; VARELLA; SUFFREDINI, 2007).

O extrato bruto obtido do caule de *M. anomala* foi denominado de EB127 e o extrato bruto obtido dos frutos de *B. oxycarpa*, de EB725.

Figura 1- Preparação do EB 127, de *Microplumeria anomala*, por meio da maceração sendo adicionado diclorometano:metanol na proporção de 1:1.



Fonte: CAMARGO, 2016.

#### 4.1.3 Preparo das amostras para os ensaios biológicos

Para os ensaios biológicos, os extratos vegetais orgânicos foram diluídos com dimetilsulfóxido 50% em água (DMSO50). Para serem empregados nos experimentos, os extratos foram diluídos a concentrações previamente estabelecidas, obtidas em experimentos anteriores (SILVA, CARVALHO, SARACENI et al., 2014; SILVEIRA, OLEA, MESQUITA et al., 2009). Para a EB127, usaram-se as concentrações de 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL, 300 mg/mL, 400 mg/mL, 500 mg/mL, 600 mg/mL, 700 mg/mL, 800 mg/mL, 900 mg/mL e 1000 mg/mL. Já o EB 725 usaram-se as concentrações de 3,125 mg/mL, 6,26 mg/mL, 12,5 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL, 250 mg/mL, 300 mg/mL e 400 mg/mL.

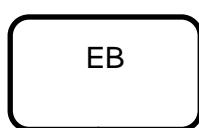
### 4.2 Análise química dos extratos

#### 4.2.1 Fracionamento dos extratos

Os extratos orgânicos 127 e 725, que apresentaram atividade, foram submetidos à partição líquido-líquido em coluna cromatográfica. Os extratos orgânicos foram ressuspensos em metanol (MeOH) 90%, para serem submetidos à extração sucessiva com  $\text{CHCl}_3$  e  $\text{BuOH}$ . As frações clorofórmica e butanólica resultantes foram levadas à capela, em temperatura ambiente, para que os solventes fossem evaporados, enquanto a fração aquosa foi congelada e posteriormente liofilizada para remoção da água. Foram obtidas as fases de partição clorofórmica (fase de partição  $\text{CHCl}_3$ ), butanólica (fase de partição  $\text{BuOH}$ ) e aquosa (fase de partição  $\text{H}_2\text{O}$ ) dos extratos brutos 127 e 725. A fase de partição clorofórmica de cada extrato foi submetida à cromatografia em coluna (CC), usando como fase estacionária Sephadex LH-20 e como fase móvel os solventes hexano (Hex), diclorometano (DCM) e metanol (MeOH), com vistas a se obter três novas frações de diferentes polaridades, como está representado na figura 2. As fases de partição  $\text{BuOH}$  e aquosa foram submetidas à cromatografia em coluna, usando como fase estacionária sílica de fase reversa C-18 e como fase móvel a mistura de solvente acetonitrila (ACN):água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA), na proporção de 10%, 50% e finalmente MeOH100%. Foram obtidas três novas frações para cada fase de partição: para a fase de partição  $\text{CHCl}_3$ , foram obtidas as frações Hex/ $\text{CHCl}_3$ , DCM/ $\text{CHCl}_3$ , MeOH/ $\text{CHCl}_3$ , para a fase de partição  $\text{BuOH}$  foram obtidas as frações 10%ACN/ $\text{BuOH}$ , 50%ACN/ $\text{BuOH}$ , MeOH/ $\text{BuOH}$  e para a fase de partição aquosa foram obtidas as frações 10%ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ , 50%ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  e MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ . No final do fracionamento foram obtidas nove frações para cada extrato, para serem avaliadas biologicamente.

A figura 2 mostra o fluxograma representando o fracionamento do EB127 por meio da partição líquido-líquido, da qual três fases de partição foram geradas ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{BuOH}$  e aquosa). Depois, foram feitas cromatografias em coluna C-18 e Sephadex LH-20, gerando cada uma três frações.

Figura 2 – Fluxograma representativo do fracionamento dos extratos bruto de *Microplumeria anomala* e *Buchenavia oxyacarpa*, usando técnicas de partição líquido-líquido e técnicas de cromatografia em coluna C-18 e Sephadex LH-20, que resultaram em nove frações.



Partição líquido-líquido

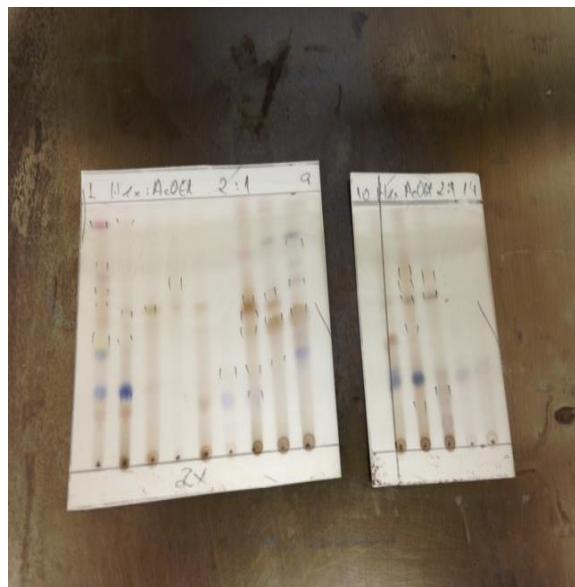
Fonte: a autora

## 4.2.2 Técnicas cromatográficas empregadas no fracionamento

### 4.2.2.1 Cromatografia em camada delgada analítica e preparativa

A cromatografia em camada delgada analítica (CCD) foi empregada para analisar as frações geradas do fracionamento e avaliá-las quanto à semelhança. Para isso, foram empregadas placas de sílica gel GF254 (Merck), em que as amostras foram aplicadas e eluídas em solvente ou mistura de solventes. Após o desenvolvimento da placa, as amostras foram reveladas com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 20% seguido de aquecimento. As frações que apresentaram manchas aparentemente isoladas foram submetidas à CCD preparativa, para o isolamento (figura 3).

Figura 3 - Cromatografia em camada delgada analítica das amostras gerada das frações do EB127 de *Microplumeria anomala*, eluídas duas vezes em hexano: acetato de etila, na proporção de 2:1.

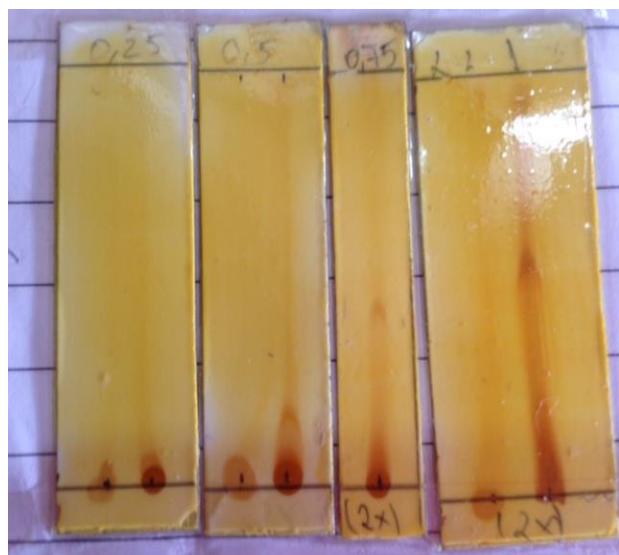


Fonte: CAMARGO, 2016

A CCD preparativa foi feita segundo os mesmos parâmetros utilizados para a CCD analítica, salvo a sílica usada, que foi a sílica gel PF (Merck).

Por meio CCD analítica, também foi realizados testes com reagentes de Dragendorff para verificar a presença de alcaloides nas frações geradas (figura 4).

Figura 4 - Cromatografia em camada delgada analítica da amostra gerada das frações do EB127 de *Microplumeria anomala* eluídas duas vezes em clorofórmio: acetato de etila: metanol, na proporção de 2:2:0,25/0,5/0,75/1 e reveladas com reagente de Dragendorff.



Fonte: CAMARGO, 2016

#### 4.2.2.2 Cromatografia em coluna

A cromatografia em coluna (CC) foi empregada para se realizar o fracionamento das fases de partição dos extratos brutos EB127 e EB725. Para isso, para a fase de partição  $\text{CHCl}_3$ , foi usada como fase estacionária sílica gel fase normal e como fases móveis os solventes hexano (Hex), diclorometano (DCM) e metanol (MeOH), de acordo com a polaridade crescente. Já para as fases de partição  $\text{BuOH}$  e aquosa, foi usada como fase estacionária Sephadex LH-20 (Merck) e como fases estacionárias os solventes (ou mistura de solventes) acetonitrila 10% em água (10%ACN), acetonitrila 50% em água (50%ACN) e metanol 100% (MeOH).

A CC também foi utilizada para o fracionamento dos alcaloides totais obtidos pelo meio básico (AT2267) a partir de *M. anomala*, cuja obtenção está descrita no item 4.2.4.1.1. Com a amostra AT2267, foi realizada uma cromatografia em coluna aberta em fase reversa C-18, utilizando fases móveis constituídas de diferentes

concentrações de gradiente de polaridade decrescente de acetonitrila e água acidificada com 0,1% de  $H_3PO_4$ , conforme descrito a seguir.

- 900 mL de 7% de acetonitrila e 0,1% de água ácida;
- 500 mL de 11% de acetonitrila e 0,1% de água ácida;
- 500 mL de 15% de acetonitrila e 0,1% de água ácida;
- 500 mL de 25% de acetonitrila e 0,1% de água ácida;
- 500 mL de 50% de acetonitrila e 0,1% de água ácida;
- 500 mL de 100% metanol;

Após a realização das eluições, as frações foram levadas à capela para a evaporação dos solventes. Posteriormente, foram alocadas em congelador e lyophilizadas.

#### 4.2.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A obtenção do perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), da fração  $MeOH/CHCl_3$ , das frações da fase de partição  $BuOH$  e da fase de partição  $H_2O$  foram obtidas, uma vez que compostos de alta polaridade são mais facilmente analisados por técnicas desenvolvidas em sílica de fase reversa. As amostras foram pesadas (1,0 mg), solubilizadas em  $MeOH$  (2 mL) e filtradas com filtros Millex<sup>TM</sup> JBR13LCR1 da Millipore (0,45  $\mu M$ ).

O sistema de eluentes foi A: água 0,1% de TFA, B: acetronitrila de grau HPLC, filtrado com filtro Phenex Filter Membranes (AFO-0504) de Nylon (0,45  $\mu M$ ) de 47 mm de diâmetro. A corrida cromatográfica foi realizada em sistema gradiente:  $T_{0 \rightarrow 5} = 5\%$  de B,  $T_{5 \rightarrow 35} = 5\%$  de B até 100% B,  $T_{35 \rightarrow 40} = 100\%$  de B,  $T_{40 \rightarrow 50} = 100\%$  de B até 5% de B,  $T_{50 \rightarrow 55} = 5\%$  de B, no CLAE da Agilent (1220LL Systems, com detector UV (254 nm) e detector DAD (1260DAD Agilent), volume de injeção foi de 20  $\mu L$ .

#### 4.2.3 Ensaios espectroscópicos empregados na identificação de substâncias

##### 4.2.3.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM)

Análise da amostra UNIP-361, obtida da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O do EB 127 foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a espectrômetro de massas com ionização por “electrospray” (CLAE-EM, Bruker Daltonics Esquire 3000).

Gradiente T0-5= 5% de ACN, T5-10= 5% de ACN, T10-11= 10% de ACN, T11-20= 10% de ACN, T20-21= 20% de ACN, T21-40= 20% de ACN, T40-41= 27% de ACN, T41-60= 27% de ACN, T60-61= 32% de ACN, T61-68= 32% de ACN, T68-69= 39% de ACN, T69-85= 39% de ACN, T85-86= 50% de ACN, T86-96= 50% de ACN, T96-106= 100% de ACN, T106-110= 100% de ACN, T110-120= 5% de ACN.

##### 4.2.3.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono

As frações purificadas, após serem analisadas por cromatografia em camada delgada analítica, foram submetidas à análise por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H; Bruker AIII, 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) e de carbono (RMN<sup>13</sup>C; Bruker AIII, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) a fim de realizar-se a elucidação estrutural das amostras.

#### 4.2.4 Extração de alcaloides

##### 4.2.4.1 A partir da planta

###### 4.2.4.1.1 Método em meio alcalino (AT2267)

- Método em meio alcalino

A extração de alcaloides a partir da espécie vegetal foi realizada com a espécie *M. anomala*. A partir de um quilograma de caule e ramos moídos, foram separados em três partes iguais e colocadas em três frascos de erlenmeyer. Em cada um dos frascos foi adicionado hidróxido de amônio na quantidade suficiente para umedecer o material vegetal seco e posteriormente adicionou-se um litro de diclorometano em cada um dos erlenmeyers, volume suficiente para manter o pó da espécie vegetal submerso. Os três frascos foram fechados e deixados em maceração por três dias, e foram agitados periodicamente durante esse período (figura 5). Posteriormente, as amostras foram filtradas e colocadas em uma bandeja para evaporar dentro da capela. As amostras foram testadas quanto à presença de alcaloides com reagente de Dragendorff. A extração de alcaloides se repetiu por mais seis vezes, até a observação de reação negativa.

Figura 5 - **(a)** Amostra 2267 de *Microplumeria anomala* triturada e separada em três partes iguais para fazer a extração dos alcaloides totais a partir da planta. **(b)** Extração de alcaloides totais a partir da planta *Microplumeria anomala* no processo de descanso da amostra embebida em diclorometano e hidroxido de amônio.



Fonte: CAMARGO, 2016

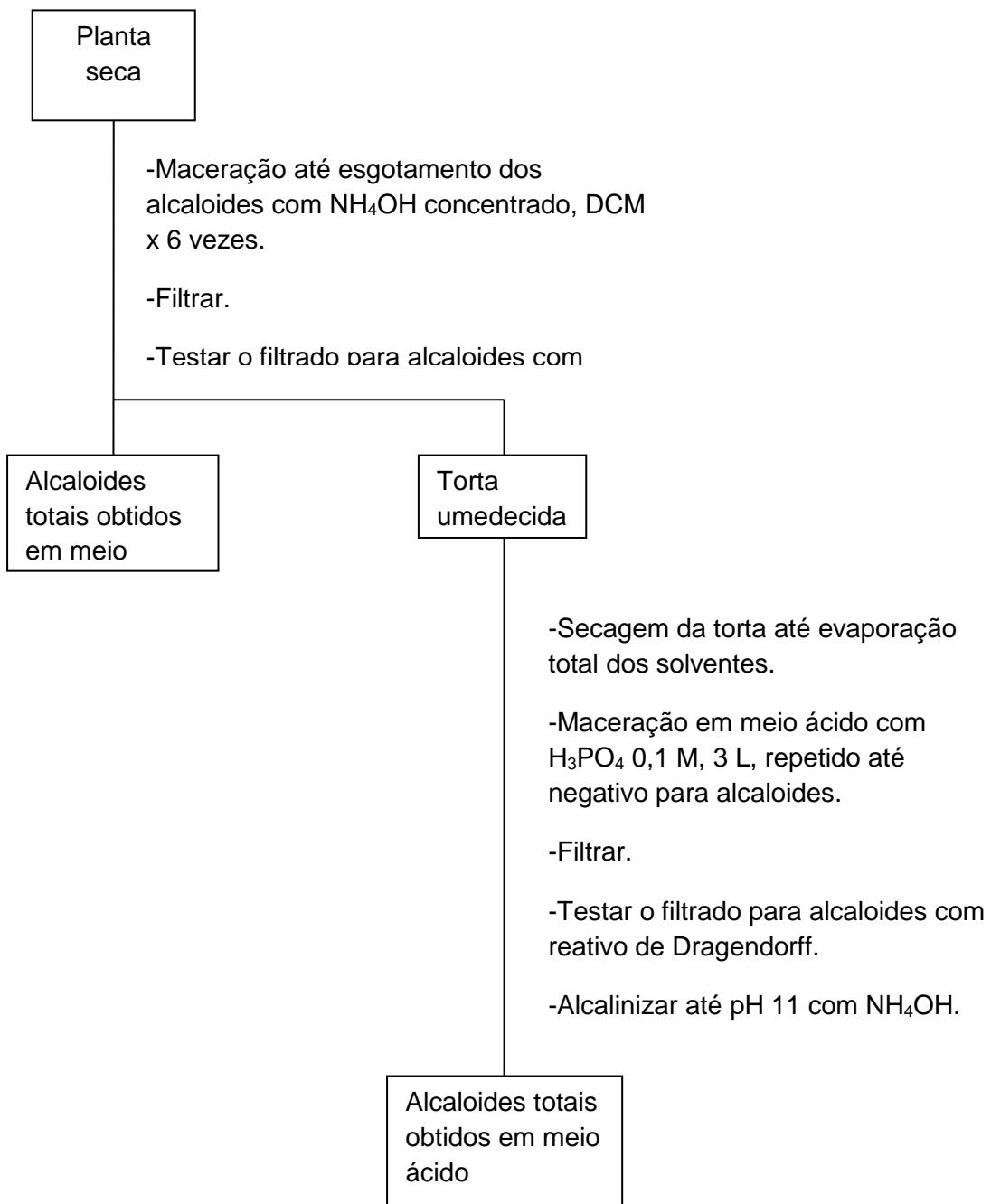
A figura 6 mostra por meio de um fluxograma todas as etapas realizadas no processo de extração de alcaloides totais a partir da espécie vegetal em meio básico e meio ácido de *M. anomala*.

#### 4.2.4.1.2 Método em meio ácido (AT2268)

Após a extração de alcaloides pelo método básico, a torta seca foi novamente separada em três porções iguais e foi colocada em maceração com três litros de ácido fosfórico. O macerado originou a fase aquosa ácida.

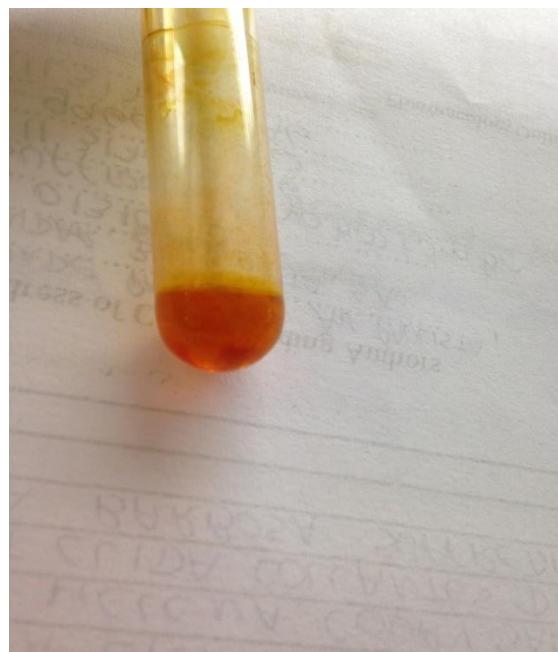
A fase aquosa ácida foi testada com reagente de Dragendorff, cujo resultado foi positivo para alcaloides. Em seguida, esse procedimento de maceração foi repetido, até que o teste com o reagente de Dragendorff desse negativo (figura 7). Na fase aquosa ácida, que contém o alcaloide, foi adicionado o hidróxido de amônio até atingir o pH 11. Durante o processo de alcalinização, um precipitado é gerado (fosfato de amônio) e retirado por filtração. A fase aquosa que contém o alcaloide, agora alcalinizada, permaneceu na capela até evaporação dos compostos voláteis. A água remanescente foi retirada pelo processo de liofilização (figura 6).

Figura 6 – Fluxograma representativo da extração de alcaloides totais a partir da espécie vegetal *Microplumeria anomala* em meio alcalino e meio ácido



Fonte: DÍAZ, 2016.

Figura 7- Teste com o reagente de Dragendorff para verificação da presença de alcaloides durante os processos de obtenção de alcaloides totais de *Microplumeria anomala* e de *Buchenavia oxyacarpa*.



Fonte: CAMARGO, 2016

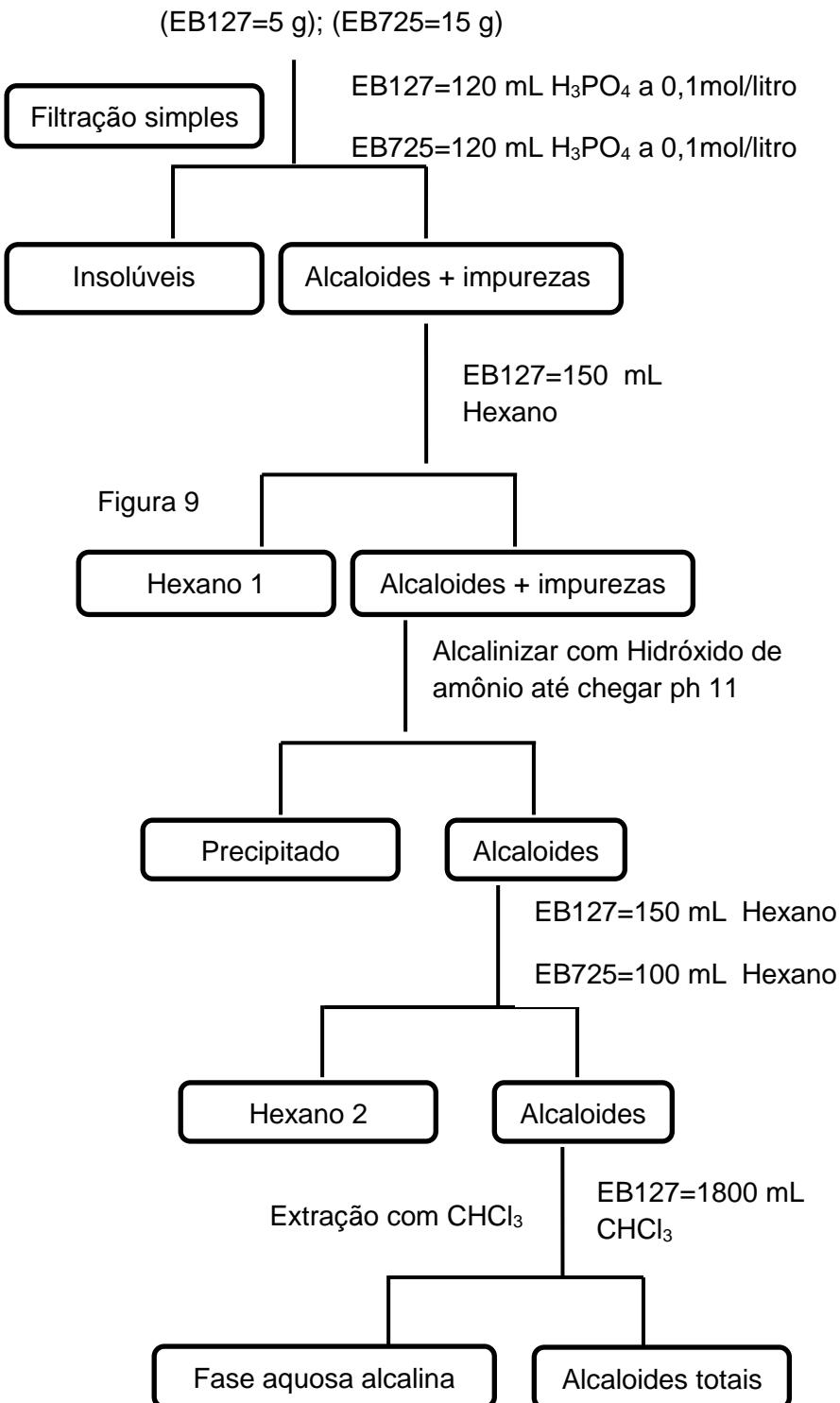
#### 4.2.4.2 A partir do extrato bruto

##### 4.2.4.2.1 Método em meio ácido

A extração de alcaloides totais a partir do extrato bruto foi realizada com os EB127 e EB725, como mostra a figura 8:

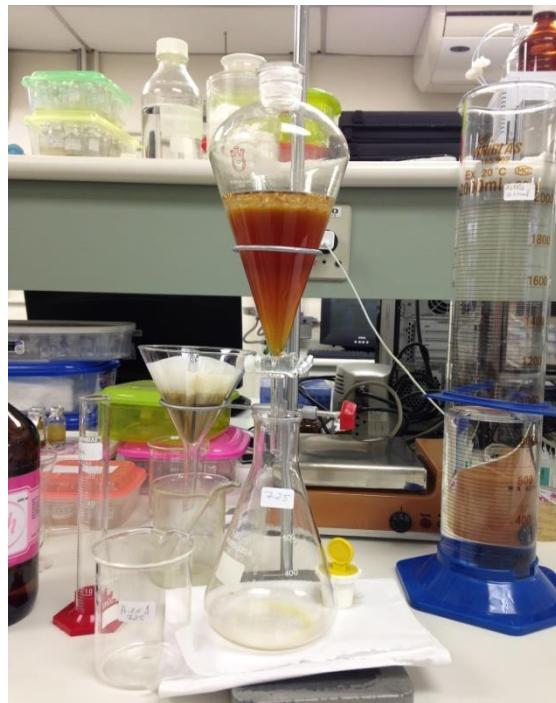
A figura 8 mostra por meio de um fluxograma o processo de extração de alcaloides totais a partir do EB127 e EB725 método ácido.

Figura 8 - Fluxograma da extração de alcaloides totais dos extratos brutos de *Microplumeria anomala* (EB127) e *Buchenavia oxycarpa* (EB725) pelo método ácido.



Fonte: a autora

Figura 9 - Extração de alcalóides totais a partir do EB 725 de *Buchenavia oxycarpa* no processo de adição do hexano.



Fonte: CAMARGO, 2016.

### 4.3 Análise biológica

#### 4.3.1 Ensaio antimicrobiano

##### 4.3.1.1 Cepas bacterianas utilizadas

Foram utilizadas bactérias pertencentes à espécie *Escherichia coli* ATCC 25922, obtidas de culturas frescas, cepas de *Escherichia coli* 31/1A, 35A e 51A obtidas da cloaca de aves marinhas (gentilmente cedidas pela Professora Doutora Vania Maria de Carvalho), que foram submetidas a estudos prévios (não contemplados no presente estudo, cujos dados foram gentilmente fornecidos pela professora Dra. Vania M. de Carvalho) para determinar o grau de virulência e da resistência microbiana. A

tabela 1 mostra as características das três cepas isoladas da cloaca de aves, variando entre si a virulência e resistência a antibióticos.

**Tabela 1 - Patogenicidade das três cepas de *Escherichia coli*, coletadas de cloaca de aves marinhas.**

Genes de Virulência	Nº Cepas de <i>Escherichia coli</i>		
	31/1 <sup>a</sup>	35A	51A
<b>papC</b>	+	-	+
<b>fyuA</b>	+	-	+
<b>iucD</b>	+	-	+
<b>ibeA</b>	+	-	-
<b>malX</b>	+	-	+
<b>traT</b>	+	-	+
<b>colV</b>	+	-	+
<b>iroN</b>	+	-	+
<b>OmpT</b>	+	-	+
<b>hlyF</b>	+	-	+
<b>lss</b>	+	-	+
<b>iutA</b>	+	-	+
<b>Resistência a Antibióticos</b>	Amp., Amo., Cef.	Amp., Amo., Tet., Fluor., Sulfa.+Trim.	X

Legenda: Amo. = amoxicilina; Cef = cefalexina; Amp.= Ampicilina; Tet.= tetracilina; Fluor. Fularquinolona; Sulfa.=sulfametoxazol; Trim.= trimetoprim; ATBC =antibiótico; + =há a presença do gene de virulência; - = não há a presença do gene de virulência; X= sensível a antibióticos.

Fonte: CARVALHO, 2012.

#### 4.3.1.2 Ensaio da disco difusão em agar

A mesma técnica de preparação dos experimentos foi adotada para todas as cepas de *E. coli*. Preparou-se uma suspensão bacteriana a 0,5 Mc Farland (ou 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL) a partir de culturas frescas da bactéria. Placas de Petri preparadas com 15 mL de meio de cultura Müller–Hinton ágar (Oxoid®), preparado conforme instruções do fabricante, em condições estéreis. E foram inoculadas pela técnica da semeadura em superfície (EUCAST, 2015) utilizando-se swabs estéreis. Em cada placa realizava o ensaio de duas amostras. Esse ensaio foi realizado em triplicata, ou seja, para cada amostra foram utilizados três discos estéreis de papel filtro de 6 mm de diâmetro (Cefar) e distribuídos com auxílio de pinças estéreis em pontos equidistantes, para que pudesse haver o desenvolvimento dos halos, caso houvesse

ação bactericida ou bacteriostática. Sobre cada disco de papel, foram colocados 10  $\mu\text{L}$  de cada extrato a ser testado. Foram realizadas marcações nas laterais das placas para servirem de guia para a leitura dos resultados e os números dos extratos foram anotados na tampa da placa de Petri sobre seus respectivos discos. As placas foram colocadas em uma estufa regulada a uma temperatura de 36 °C, por 24 horas. Após esse período, foi avaliada a atividade antibacteriana através da formação do halo de inibição ao redor do disco, e os resultados foram determinados a partir da medida dos diâmetros verticais e horizontais, com o auxílio de um paquímetro eletrônico.

#### 4.3.1.3 Delineamento experimental

Os ensaios foram realizados com os extratos brutos, frações e substâncias isoladas, aplicadas em discos de papel filtro de 6 mm, em triplicata, em placas de Petri de 120 mm de diâmetro. Cada placa de Petri recebeu dois grupos. Para cada halo gerado foram tomadas as medidas das diagonais concorrentes (vertical e horizontal), totalizando seis medidas para cada tratamento. O mesmo procedimento foi repetido para todas as análises.

#### 4.3.1.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância Anova de uma entrada, com teste posterior de Dunnett para comparação com grupo controle. Diferenças estatísticas foram consideradas em um nível de significância de  $\alpha<0,05$  (GraphPadPrism).

#### 4.3.1.5 Ensaio da microdiluição em caldo

Novamente, a mesma técnica de preparação dos experimentos foi adotada para todas as cepas de *E. coli*. Os extratos testados em triplicata que apresentaram a confirmação da atividade antibacteriana foram submetidos ao teste da microdiluição

em caldo, e foi utilizado o meio de cultura Müller–Hinton caldo (MDC; Oxoid®), preparado conforme instruções do fabricante, em condições estéreis. Colônias frescas de *Escherichia coli* foram obtidas e utilizadas para o preparo da suspensão bacteriana a 0,5 Mac Farland. Foram adicionados 190 µL da suspensão em cada poço da microplaca de 96 poços. Diferentes dosagens dos extratos foram adicionadas aos poços em duplicata, em um volume de 10 µL. Por medidas de controle experimental, alguns poços foram reservados para controle positivo (meio inoculado sem tratamento) e controle negativo (meio sem inóculo e sem tratamento). Essa técnica foi usada para obtenção das concentrações inibitórias mínimas e concentrações bactericidas mínimas de cada amostra testada.

Para os ensaios, os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido 50% ou em água destilada, dependendo de sua origem, orgânica ou aquosa, respectivamente. Após esse procedimento, as placas foram tampadas e colocadas em estufa a temperatura 36 °C, por 24 horas. Os resultados foram avaliados através da realização de subcultura, descrita a seguir.

Após as 24 h de incubação, cada um dos poços foram testados por meio da subcultura em meio Müller–Hinton ágar. Para isso, placas de Petri preparadas com meio Müller–Hinton ágar foram usadas, de modo que quadrados delimitantes foram desenhados no lado de fora da placa e identificados. Em cada quadrado identificado foi feito o espalhamento de 2 µL do meio caldo contido nos poços em análise. Após esse procedimento, as placas foram tampadas e colocadas em estufa à temperatura 36 °C, por 24 h. Por meio desse método, foi possível confirmar a eficácia da atividade antibacteriana dos extratos e determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e as concentrações bactericidas mínimas (CBM) para cada extrato ativo.

#### 4.3.2 Avaliação da citotoxicidade

O conjunto de células empregado nos ensaios é composto por adenocarcinomas isolados de mama (MCF-7) e de próstata (PC-3). A avaliação da atividade citotóxica foi realizada segundo a metodologia descrita por Monks,

Scudiero, Skehan et al. (1991), com adaptações (SUFFREDINI, PACIENCIA, VARELLA et al., 2007a e b, SUFFREDINI, PACIENCIA, VARELLA et al., 2006).

Previamente ao ensaio, as células foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (Bio Whittaker) acrescido de 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina (Sigma) e antibióticos por um período de 96 horas. Esse meio de cultura foi empregado durante todo o experimento. Após esse período, cada célula foi preparada de acordo com a densidade celular necessária, de 10.000 e 7.500 células/poço para as células de mama e de próstata, respectivamente (MONKS, SCUDIERO, SKENHAN et al., 1991). Placas de 96 poços foram desenhadas de modo a apresentarem grupo controle de crescimento celular, grupo controle de atividade óptica resultante do meio+extrato, grupos testes que receberam as amostras de extratos e frações. Além das placas de 96 poços utilizadas para execução dos testes, foi feita uma placa com células tumorais sem tratamento para que representasse o crescimento celular até o momento anterior à adição dos tratamentos. A leitura dessa placa resultou na obtenção do valor correspondente ao tempo zero (T0).

Para o procedimento experimental, 100  $\mu$ l de meio + células foram adicionados aos poços correspondentes, inicialmente. As placas de 96 poços foram levadas à incubadora, a 37 °C, umidade relativa de 100% e 5% de CO<sub>2</sub>, onde permaneceram por 24 h. Após 24 h, 100  $\mu$ L de meio + tratamento foram adicionados aos poços correspondentes, e 100  $\mu$ L de meio aos poços controle. A preparação dos meios + tratamentos foi feita em recipientes de vidro, em que em 1990  $\mu$ l de meio foram adicionados 10  $\mu$ L do tratamento, diluído em 40 mg/ml. Desse modo, ao se adicionar os 100  $\mu$ L correspondentes a cada poço do grupo tratamento, ocorreu uma diluição de 400 vezes, gerando uma concentração final de 100 ug/mL, no poço. Após a adição dos tratamentos, as placas de 96 poços foram incubadas a 37 °C, umidade relativa de 100% e 5% de CO<sub>2</sub>, por um período de 48 horas. Ao mesmo tempo, as placas T0, com um dos controles de crescimento, foi preparada para ser lida, segundo procedimento descrito abaixo.

Depois desse período de 72h do início do experimento, as células viáveis foram fixadas nas placas de 96 poços com solução de ácido tricloroacético 50%, e foi mantida em contato com as células por uma hora, sob refrigeração. As placas foram lavadas cinco vezes com água corrente até remoção completa do agente fixador e das células não fixadas (mortas). As placas foram mantidas ao ar por 24

horas, para secarem. Depois desse período, 100  $\mu$ L de uma solução de sulforrodamina B (SRB, que se liga a proteínas mitocondriais de células viáveis), preparada a 0,4% em ácido acético 1%, foi adicionada às células, por 10min. O excesso de SRB foi retirado com solução de ácido acético (1%), com auxílio de lavador de microplacas. Após a remoção do excesso do corante de viabilidade celular, as placas foram novamente expostas ao ar para secarem por mais 24 h. O corante remanescente nas células viáveis foi ressuspenso com 100  $\mu$ L de tampão Tris e foi submetido a 10 min de agitação em agitador de placas. Depois desse período, as placas foram lidas em leitor espectrofotométrico de placas (Biotek) em 515 nm, em que as atividades ópticas foram obtidas. A porcentagem de inibição de crescimento (% IC) foi obtida a partir da fórmula:

$$\% \text{ IC} = [(T - T_0) / (C - T_0)] * 100$$

sendo:

T: valores de densidade óptica obtidos para os poços correspondentes ao tratamento.

T0: valores de densidade óptica obtidos para os poços correspondentes ao tempo zero. O tempo zero representa o crescimento celular nas 24 h que antecedem a adição do tratamento.

C: valores relativos ao crescimento celular sem o tratamento, ou controle do crescimento 100%.

Caso tenha havido resultado de inibição de crescimento, a amostra correspondente é submetida à análise para obtenção da concentração de inibição 50% (IC50), em que os tratamentos são testados em cinco diluições logarítmicas subsequentes, de 100  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL, 0,1  $\mu$ g/mL e 0,01  $\mu$ g/mL.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 *Microplumeria anomala*

#### 5.1.1 Resultados botânicos

A partir da utilização da técnica de disco difusão em ágar (DDA), foram testados 1791 extratos vegetais contra a bactéria *E. coli*. Apenas os EB127, EB272, EB725 e EB934 foram ativos (CAMARGO; SUFFREDINI, 2015). Para o presente trabalho, somente os extratos brutos orgânicos foram estudados.

A tabela 2 relaciona os dados botânicos e de coleta referentes às espécies que originaram os extratos ativos, apresentados em trabalhos anteriores.

**Tabela 2 - Dados botânicos e de coleta do caule de *Microplumeria anomala* cujo extrato foi ativo contra *Escherichia coli* foi selecionado em trabalhos prévios.**

Coletor	PSC
Número da coleta	136
Data da coleta	19-04-1997
Família	Apocynaceae
Espécie	<i>Microplumeria anomala</i> (Müll. Arg.) Markgr.
Número do extrato	EB127
Parte da planta	Caule
Rendimento	2,55%
Localização	Novo Airão Arquipélago de Anavilhas, próximo à cidade

Legenda: PSC=sigla referente ao coletor.

Fonte: CAMARGO; SUFFREDINI, 2014.

#### 5.1.2 Resultados da análise química das frações de EB127

A tabela 3, a seguir, mostra os pesos obtidas do EB127 e das 9 frações geradas por meio da partição líquido-líquido e cromatografia em coluna.

**Tabela 3 - Massas das fases de partição geradas e suas frações a partir do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.**

<b>Extrato bruto</b>	<b>10,4123g</b>
<b>Fração de partição CHCl<sub>3</sub></b>	<b>3,7228g</b>
Fração de Hexano	3,0304g
Fração DCM	0,6569g
Fração MeOH	0,4844g
<b>Fração de partição BuOH</b>	<b>1,4285g</b>
Fração 10%ACN	1,3656g
Fração 50%ACN	0,0590g
Fração MeOH	0,2665g
<b>Fração de partição H<sub>2</sub>O</b>	<b>1,4193g</b>
Fração 10%ACN	4,3469g
Fração 50%ACN	0,0834g
Fração MeOH	0,0136g

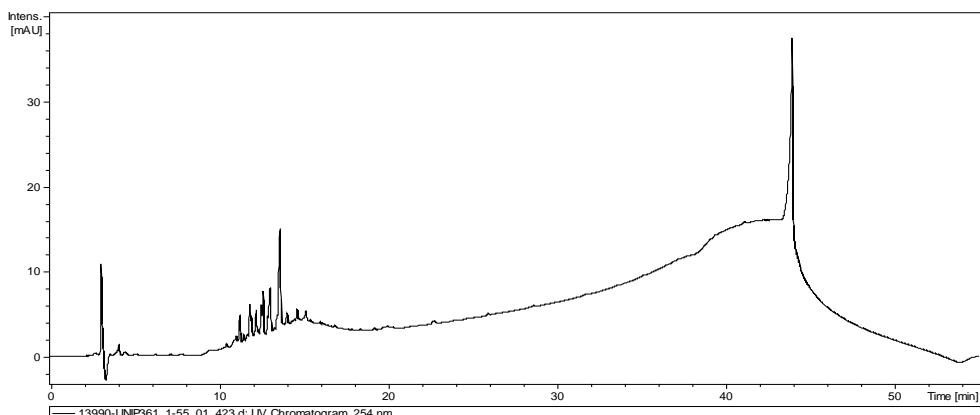
Legenda: DCM=diclorometano; MeOH=metanol; BuOH=butanol; ACN=aceto nitrila.

Fonte: a autora

Frações de maior polaridade foram submetidas à CLAE, sendo possível avaliar a presença ou ausência de compostos majoritários e o perfil cromatográfico. Por fim, frações que apresentaram pouca massa não foram avaliadas no presente trabalho, porém, encontram-se estocadas em congelador.

A fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O foi analisada em cromatografia líquida de espectrometria de massas, na tentativa de se desvendar compostos. A figura 10 mostra o cromatograma com a corrida da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O.

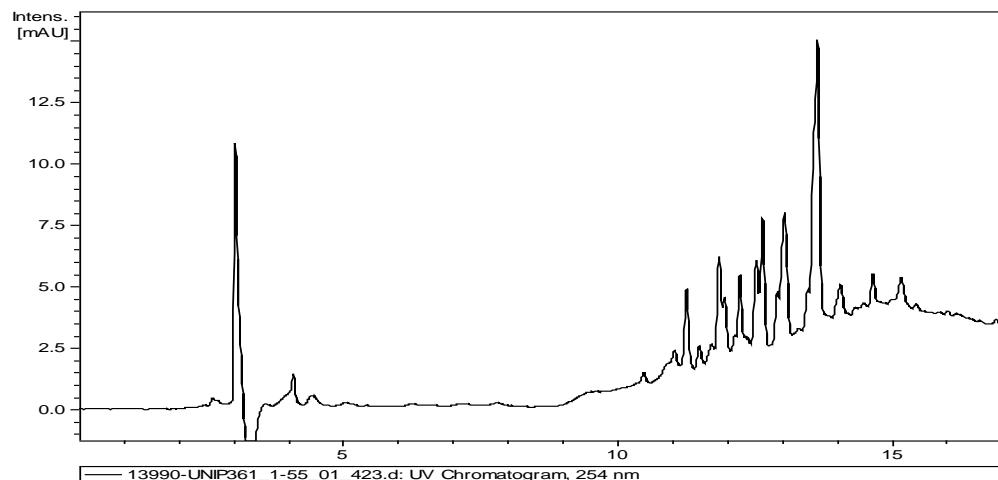
Figura 10- Cromatograma (UV,  $\lambda=254$  nm) da amostra 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 11 mostra o cromatograma ampliado da corrida nos primeiros 28 minutos da fração 10%ACN da fase de partição H<sub>2</sub>O.

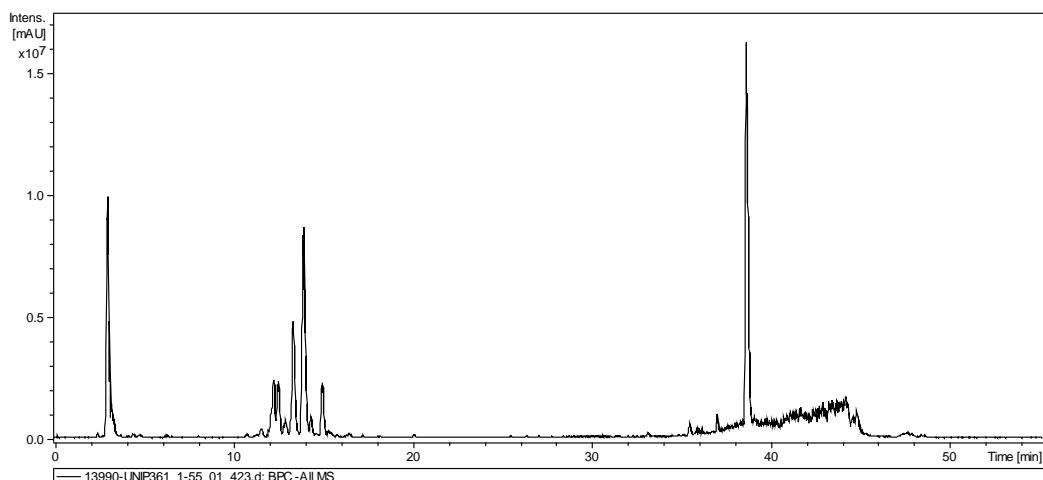
Figura 11- Cromatograma ampliado nos primeiros 28 minutos de corrida da amostra 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 12 mostra o cromatoíons no modo negativo da fração 10%ACN da fase de partição H<sub>2</sub>O.

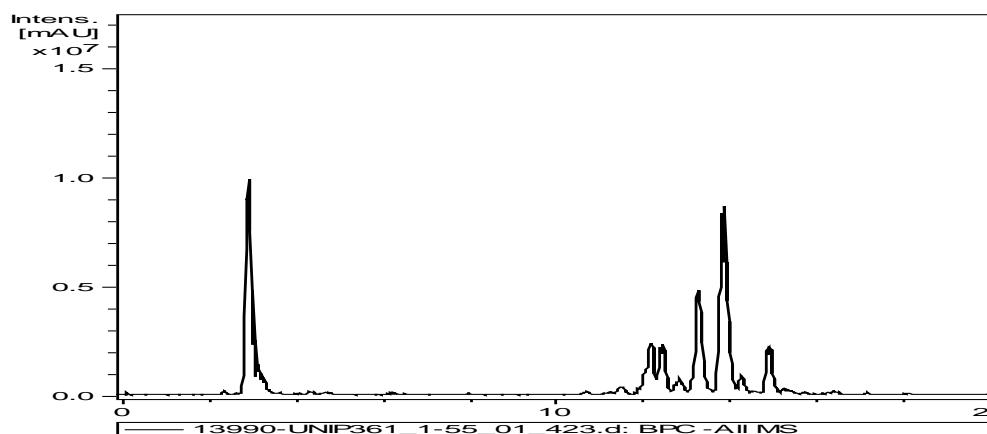
Figura 12 - Cromatoíons no modo negativo da amostra 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 13 mostra o cromatoíons no modo negativo ampliado da corrida nos primeiros 20 minutos da fração 10%ACN da fase de partição H<sub>2</sub>O.

Figura 13 - Cromatoíons no modo negativo ampliado nos primeiros 20 minutos da amostra 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*

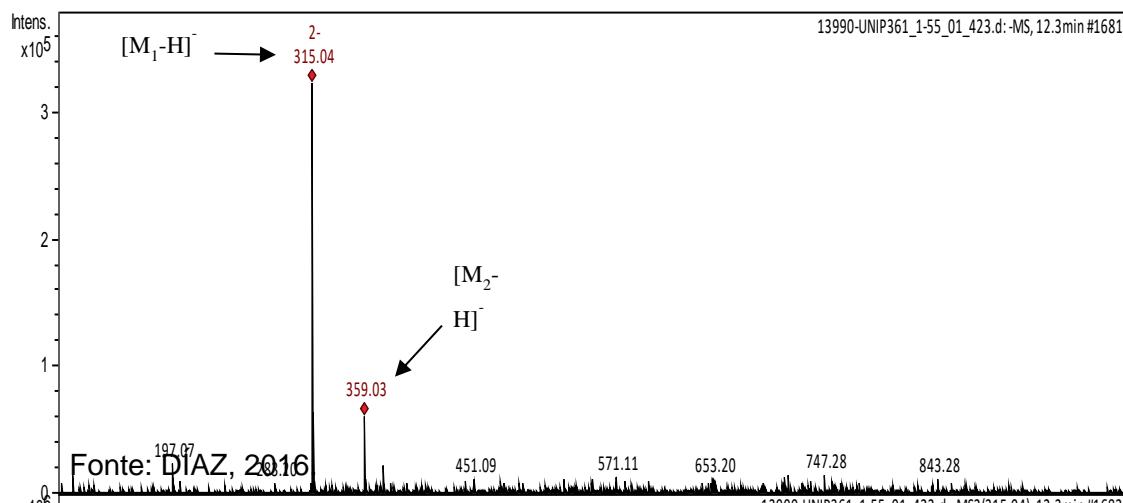


Fonte: DÍAZ, 2016.

O espectro de ESI-massas no modo negativo do sinal (pico) com tempo de retenção de 12,3 min apresenta dois compostos com íon molecular [M-H]<sup>-</sup> com *m/z* 315,04 (M<sub>1</sub>), 359,03 (M<sub>2</sub>) (figura 14). Posteriormente, o íon *m/z* 315,04 em MS<sup>2</sup> apresenta o fragmento *m/z* 152,68 [M-H-Hexo]<sup>-</sup>, em que pode ser visto na figura 15, o espectro no modo negativo MS<sup>2</sup> de [M-H]<sup>-</sup> (*m/z* 315) ácido dihidrobenzoico hexosídeo. A figura 16 mostra a fórmula molecular ácido dihidrobenzoico hexosídeo. As análises no íon *m/z* 359,03 em MS<sup>2</sup> apresenta o fragmento *m/z* 196,75 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, em que pode ser visualizado na figura 17 o espectro no modo negativo MS<sup>2</sup> de [M-H]<sup>-</sup> (*m/z* 359) ácido rosmarínico. O composto M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub>, segundo a literatura, é ácido dihidrobenzoico hexosídeo e ácido rosmarínico (PAREJO; JAUREGUI; VILADOMAT et al., 2004).

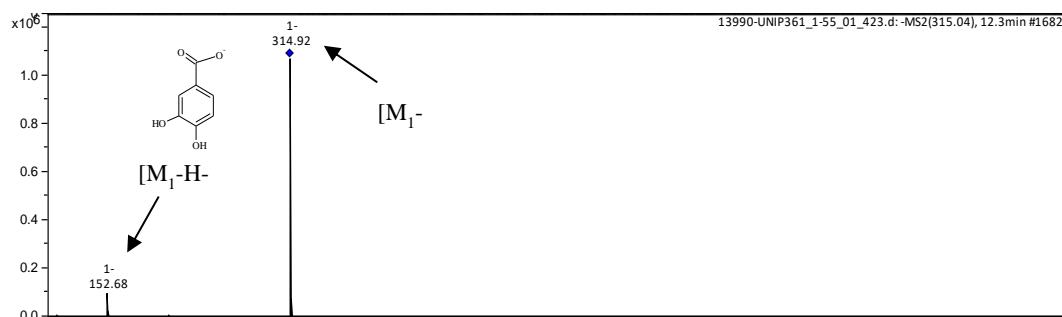
A figura 14 mostra o espectro de massas no modo negativo no pico de 12,3 minutos, em que é possível visualizar a presença de dois compostos com íon molecular [M-H]<sup>-</sup> com *m/z* 315,04 (M<sub>1</sub>), 359,03 (M<sub>2</sub>).

Figura 14 - Espectro ESI<sup>-</sup> do pico aos 12,3 min originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



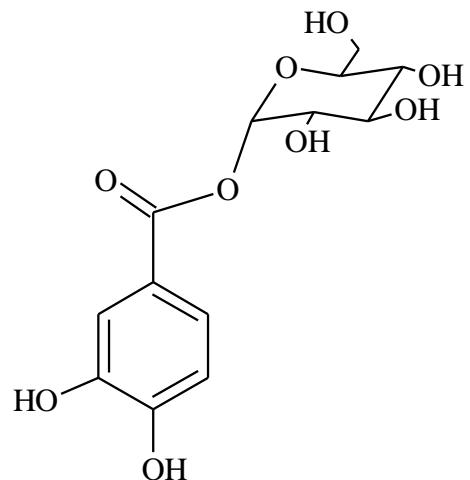
A figura 15 mostra o espectro de massas no modo negativo de ácido dihidrobenzoico hexosídeo representado por M<sub>1</sub>.

Figura 15- Espectro no modo negativo MS<sup>1</sup> de [M-H]<sup>-</sup> (*m/z* 315) ácido dihidrobenzoico hexosídeo, obtido a partir da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



A figura 16 mostra a estrutura molecular de ácido dihidrobenzoico hexosídeo, que é representado por  $M_1$ .

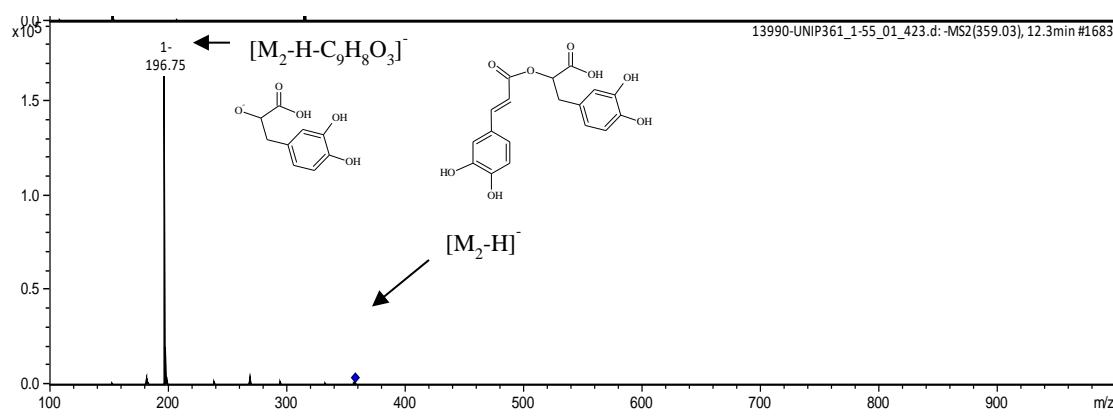
Figura 16 - Estrutura molecular de ácido dihidrobenzoico hexosídeo ( $M_1$ ) obtido a partir da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 17 mostra o espectro de massas no modo negativo, em que é possível visualizar a presença do ácido rosmarínico representado por  $M_2$ .

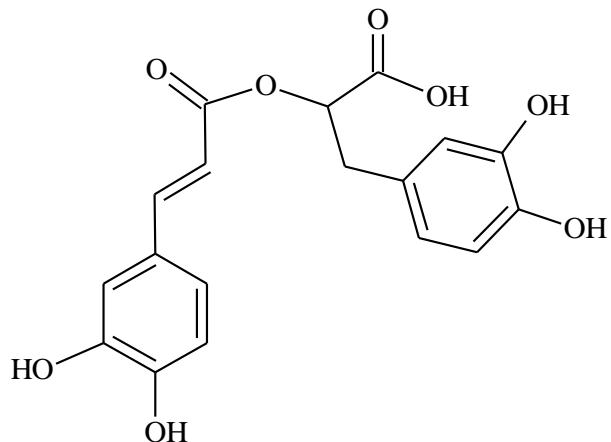
Figura 17 - Espectro no modo negativo MS<sup>2</sup> de [M-H]<sup>-</sup> (m/z 359) ácido rosmarínico obtido a partir da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 18 mostra a estrutura molecular de ácido rosmarínico que é representado por  $M_2$ .

Figura 18 - Estrutura molécula de ácido rosmarínico ( $M_2$ ), obtido a partir da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.

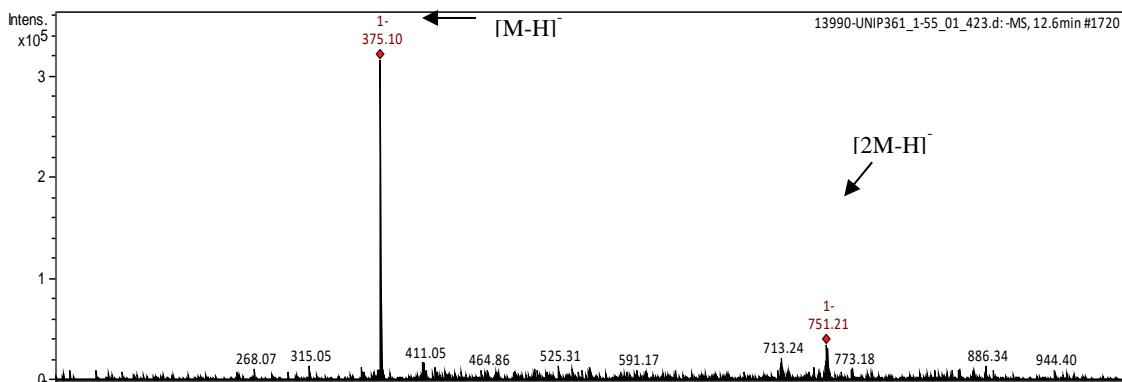


Fonte: DÍAZ, 2016.

O espectro de ESI-massa no modo negativo do sinal (pico) com tempo de retenção de 12,6 min, apresenta o íon molecular  $[M-H]^-$  com  $m/z$  375,1 (figura 19). Posteriormente, o íon  $m/z$  375,1 em  $MS^2$  apresenta os fragmentos  $m/z$  212,78  $[M-H-Glc]^-$  e o fragmento  $m/z$  168,77  $[M-H-Glc-CO_2]^-$ , sendo possível ver na figura 20 o espectro no modo negativo  $MS^2$  de  $[M-H]^-$  ( $m/z$  375,10), um iridoide. O espectro de massas sugere que pode ser um dos seguintes isômeros ácido 8-*epi*-logânico ou ácido logânico (LIAN-WEN; CHUN-YUN; PING, 2009).

A figura 19 mostra o espectro de massas de modo negativo no pico de 12,6 minutos, sendo possível visualizar a presença do composto íon molecular  $[M-H]^-$  com  $m/z$  375,1.

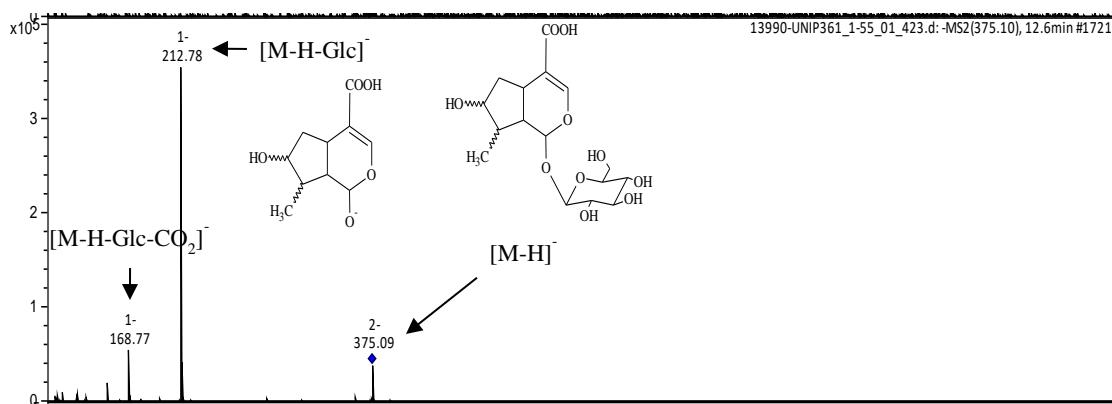
Figura 19 - Espectro ESI<sup>-</sup> do pico aos 12,6 min originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 20 o espectro de massas de modo negativo de um iridóide representado por M<sub>2</sub>.

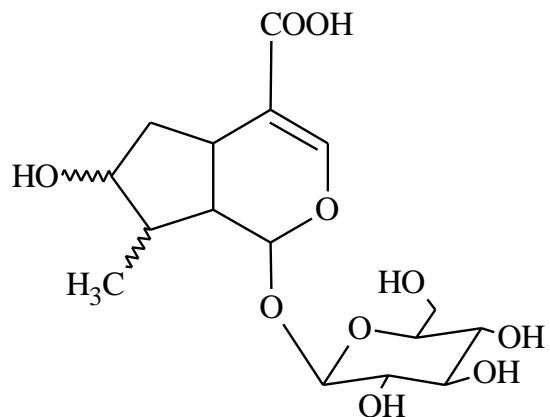
Figura 20 - Espectro no modo negativo MS<sup>2</sup> de [M-H]<sup>-</sup> (*m/z* 375,10) é um iridoide originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 21 mostra a estrutura molecular de um iridoide com peso molecular 376.

Figura 21 - Estrutura molecular de um iridoide com peso molecular 376 originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.

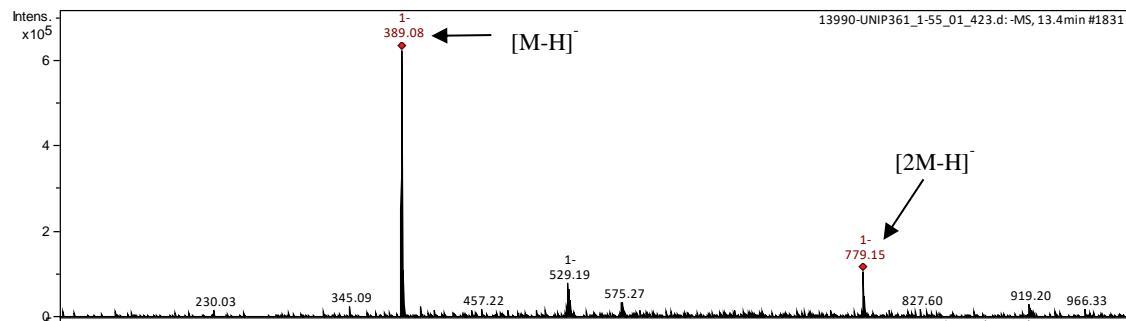


Fonte: DÍAZ, 2016.

O espectro de ESI-massa no modo negativo do sinal (pico) com tempo de retenção de 13,4 min, apresenta o íon molecular [M-H]<sup>-</sup> com *m/z* 389,08 (figura 22). Posteriormente, o íon *m/z* 389,08 em MS<sup>2</sup> apresenta os fragmentos *m/z* 371,05 [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, 345,02 [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 208,73 [M-H-H<sub>2</sub>O-Glc]<sup>-</sup>, 164,74 [M-H-H<sub>2</sub>O-Glc-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> e 120,82 [M-H-H<sub>2</sub>O-Glc-2CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, sendo possível visualizar o espectro na figura 23 no modo negativo MS<sup>2</sup> de [M-H]<sup>-</sup> (*m/z* 389,08) é um iridoide. O espectro de massas sugere que pode ser um dos seguintes isômeros: 8-*epi*-loganino ou 7-*epi*-loganino ou loganino (LIAN-WEN; CHUN-YUN; PING, 2009).

A figura 22 mostra o espectro de massas no modo negativo no pico 13,4 minutos, sendo possível visualizar a presença do íon molecular com *m/z* 389,08.

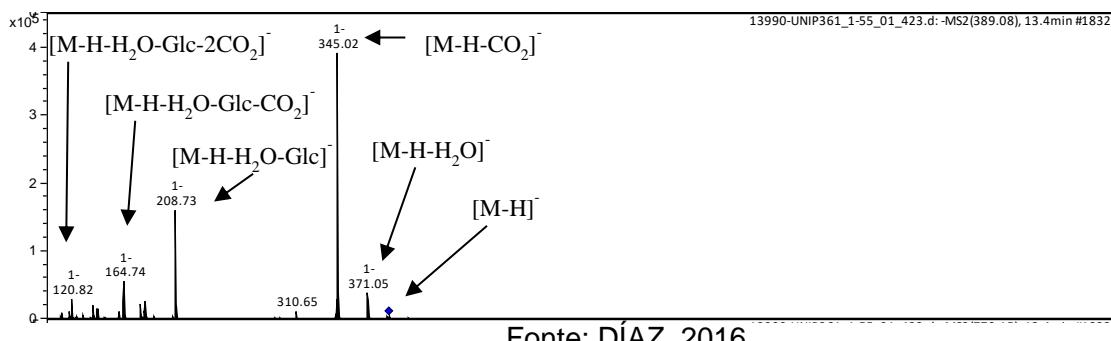
Figura 22 - Espectro ESI<sup>-</sup> do pico aos 13,4 min. originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 23 mostra o espectro de massas no modo negativo de um iridoide representado por  $\text{MS}^2$ .

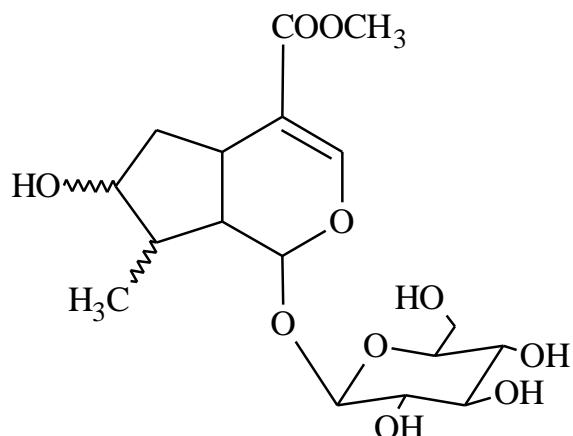
Figura 23 - Espectro no modo negativo  $\text{MS}^2$  de  $[\text{M}-\text{H}]^-$  ( $m/z$  389,08) é um iridoide originado da fração 10%ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ , obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 24 mostra a estrutura molecular do iridoide com peso molecular 390.

Figura 24 - Estrutura molecular do iridoide com peso molecular 390 originado da fração 10%ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ , obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.

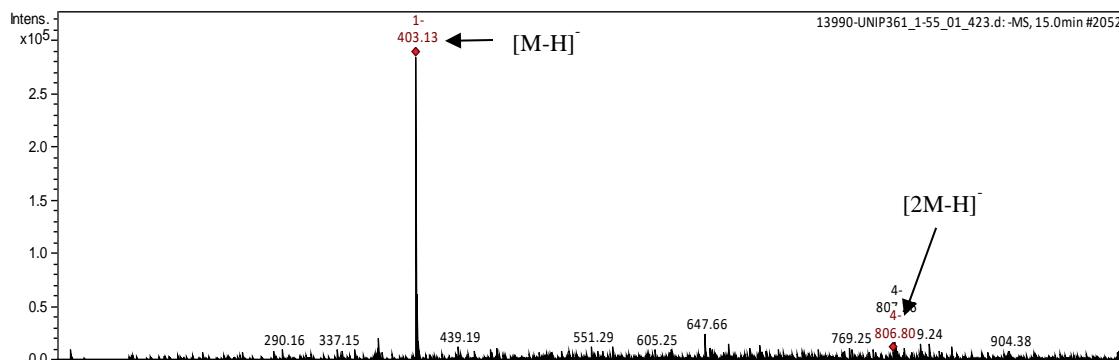


Fonte: DÍAZ, 2016.

O espectro de ESI-massa no modo negativo do sinal (pico) com tempo de retenção de 15,0 min, apresenta o íon molecular  $[M-H]^-$  com  $m/z$  403,13 (figura 25). Posteriormente, o íon  $m/z$  403,13 em  $MS^2$  apresentou os fragmentos  $m/z$  371,03  $[M-H-CH_3OH]^-$ , 222,81  $[M-H-Glc-H_2O]^-$ , sendo possível visualizar na figura 26 o espectro no modo negativo  $MS^2$  de  $[M-H]^-$  ( $m/z$  403,13) do iridoide. O espectro de massas sugere que pode ser um dos isômeros secologanosídeo-7-metil éster e secologanino (LIAN-WEN; CHUN-YUN; PING, 2009; GUO; CHEN; WANG et al., 2014).

A figura 25 mostra o espectro de massas no modo negativo de pico aos 15 minutos, representado por íon molecular  $[M-H]^-$  com  $m/z$  403,13.

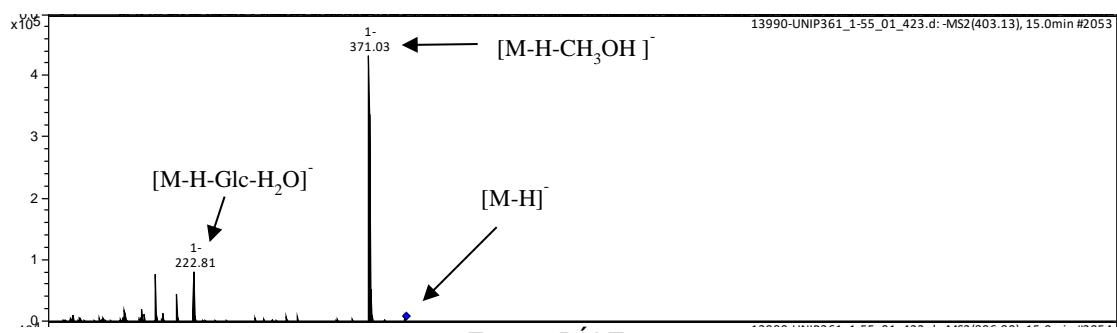
Figura 25 - Espectro ESI $^-$  do pico aos 15,0 min originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 26 mostra o espectro de massas no modo negativo do iridoide representado por  $MS^2$ .

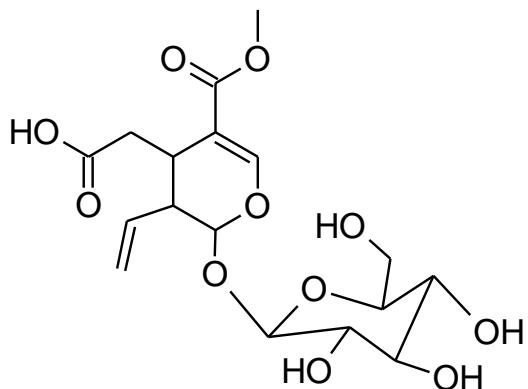
Figura 26 - Espectro no modo negativo  $MS^2$  de  $[M-H]^-$  ( $m/z$  403,13) do iridoide originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 27 mostra a estrutura molecular do iridoide com peso molecular 404.

Figura 27 - Estrutura molecular do iridoide com peso molecular 404 originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.

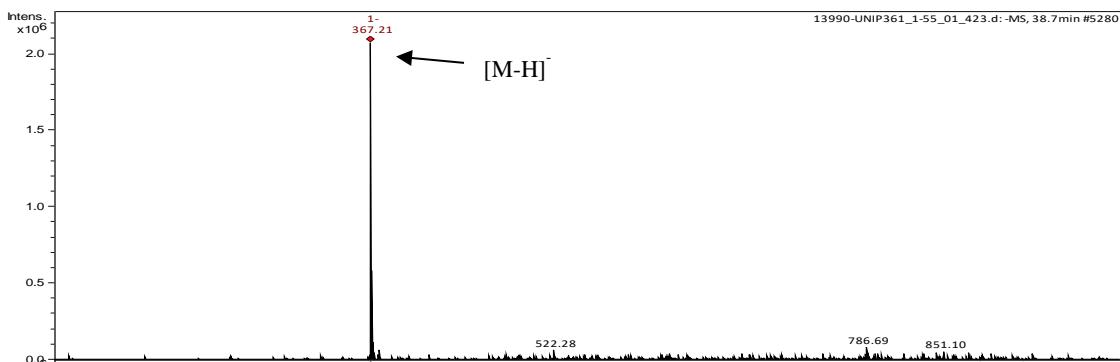


Fonte: DÍAZ, 2016.

O espectro de ESI-massas no modo negativo do sinal (pico) com tempo de retenção de 38,7 min, apresenta o íon molecular [M-H]<sup>-</sup> com *m/z* 367,21 (figura 28). Posteriormente, o íon *m/z* 367,21 em MS<sup>2</sup> apresenta o fragmento *m/z* 176,82 [M-H-ácido quínico]<sup>-</sup>, sendo possível verificar na figura 29 o espectro no modo negativo MS<sup>2</sup> de [M-H]<sup>-</sup> (*m/z* 367,21) é um ácido feruloilquínico. O espectro de massas sugere ser ácido 4-O-feruloilquínico (DOKLI; NAVARINI; HAMERSAK, 2013).

A figura 28 mostra o espectro de massas no modo negativo no pico de 38,7 minutos, sendo possível visualizar o íon molecular [M-H]<sup>-</sup> com *m/z* 367,21.

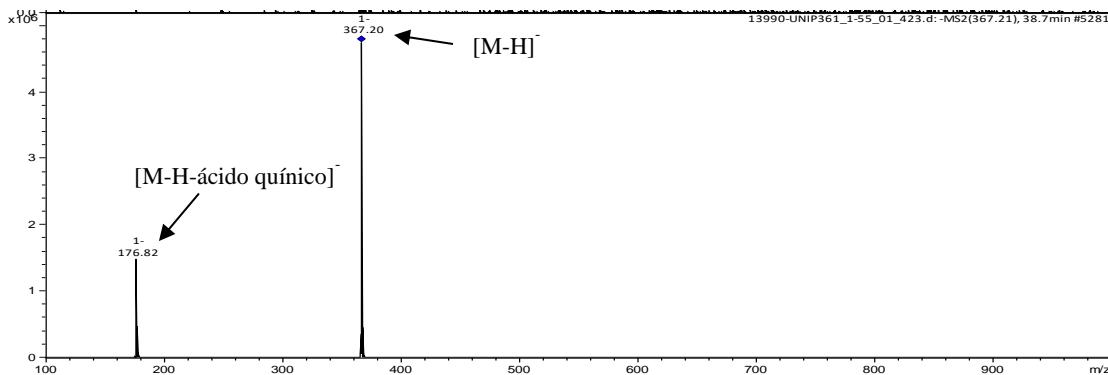
Figura 28 - Espectro ESI<sup>-</sup> do pico aos 38,7 min originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 29 mostra o espectro de massas no modo negativo do ácido feruloiquínico representado por MS<sup>2</sup>.

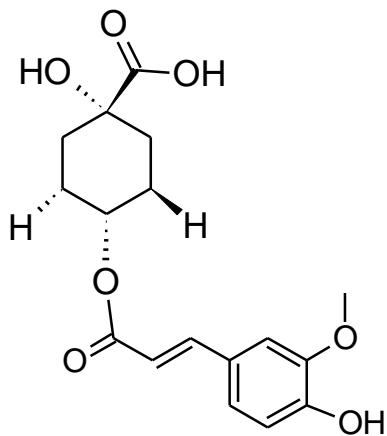
Figura 29 - Espectro no modo negativo MS<sup>2</sup> de  $[M-H]^-$  ( $m/z$  367,21) é um ácido feruloiquínico originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 30 mostra a estrutura molecular ácido 4-O-feruloiquínico.

Figura 30 - Estrutura molecular do ácido 4-O-feruloiquínico originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.

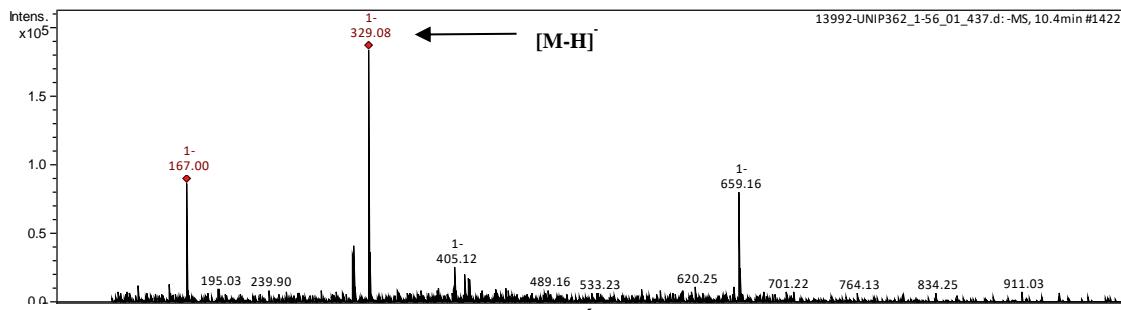


Fonte: DÍAZ, 2016.

Pela análise do espectro de massas no modo negativo de UNIP-362 com tempo de retenção de 10,4 min, observa-se a presença do ácido vanílico glicosilado, cujo peso molecular é 330, o íon molecular  $[M-H]^-$   $m/z$  329 (figura 31). Pela análise dos fragmentos, é possível observar o íon  $m/z$  166,72, que é gerado pela perda de uma

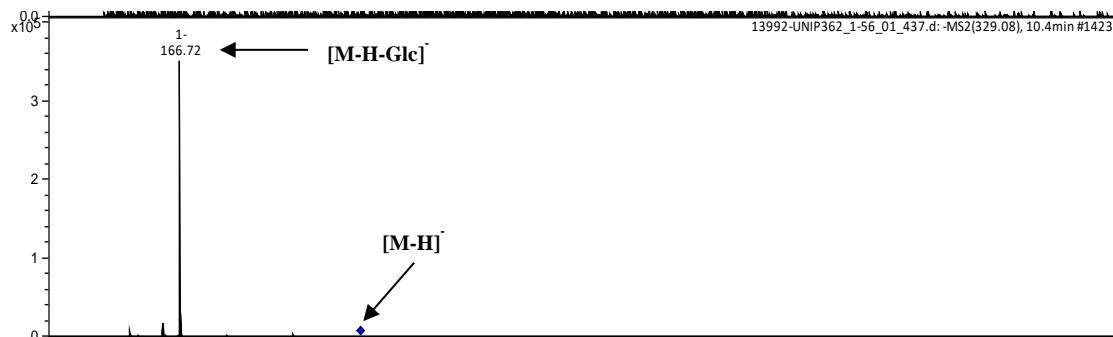
de uma molécula neutra de glicose, observado na figura 32 (PAREJO; JÁUREGUI; VILADOMAT et al 2004).

Figura 31 - Espectro de massas ESI<sup>-</sup> no modo negativo da amostra UNIP-362 a 10,4 min, da qual se isolou o ácido vanílico originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

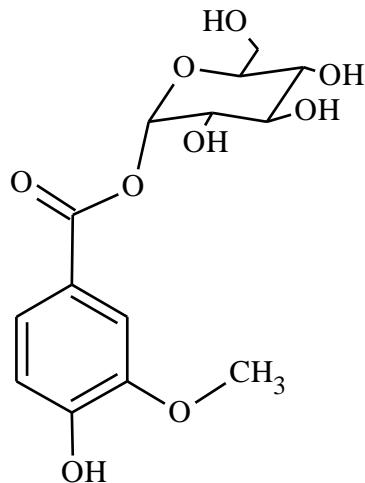
Figura 32 - Espectro de massas no modo negativo de MS<sup>2</sup> de *m/z* 329,08 [M-H]<sup>-</sup> da amostra UNIP-362, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 33 mostra a estrutura molecular do ácido vanílico glicosilado.

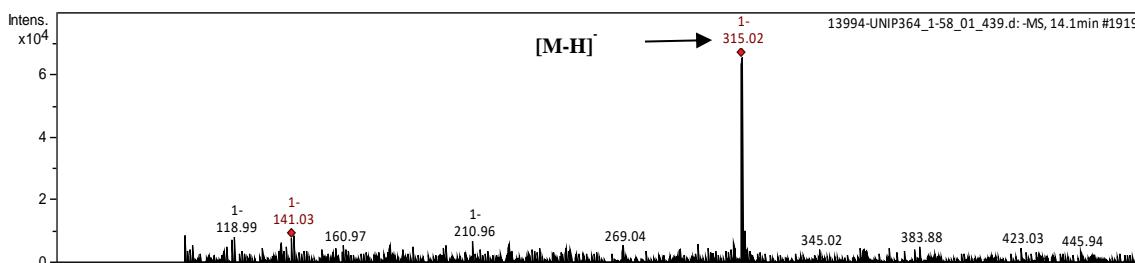
Figura 33 - Estrutura molecular do ácido vanílico glicosilado originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

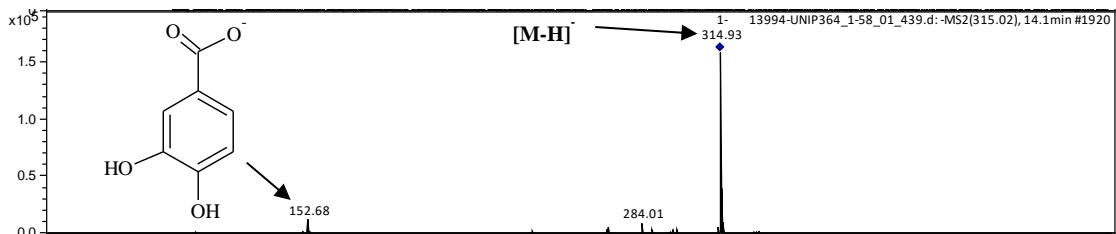
O espectro de ESI-massas no modo negativo do sinal (pico) com tempo de retenção de 14,1 min, apresenta o íon molecular [M-H]<sup>-</sup> com *m/z* 315,02 (figura 34). Posteriormente, o íon *m/z* 315,02 em MS<sup>2</sup> apresenta o fragmento *m/z* 152,68, que foi gerado pela perda da glicose (molécula neutra), sendo possível visualizar na figura 35. O espectro de massas sugere a presença do ácido protocatecuico glicosilado (PAREJO; JÁUREGUI; VILADOMAT et al 2004).

Figura 34 - Espectro de massa ESI<sup>-</sup> no modo negativo da amostra UNIP-364 a 14,1 min, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

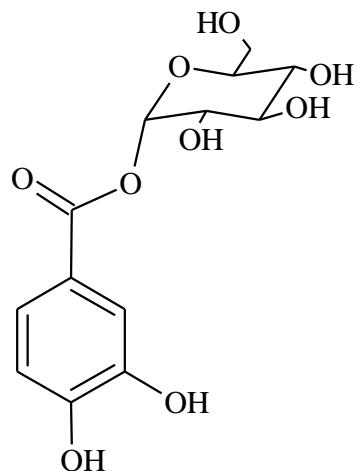
Figura 35 - Espectro de massas no modo negativo de  $MS^2$  de  $m/z$  315,02  $[M-H]^-$  da amostra UNIP-364, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 36 mostra a estrutura molecular do ácido protocatecuico glicosilado.

Figura 36 - Estrutura molecular do ácido protocatecuico glicosilado originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.

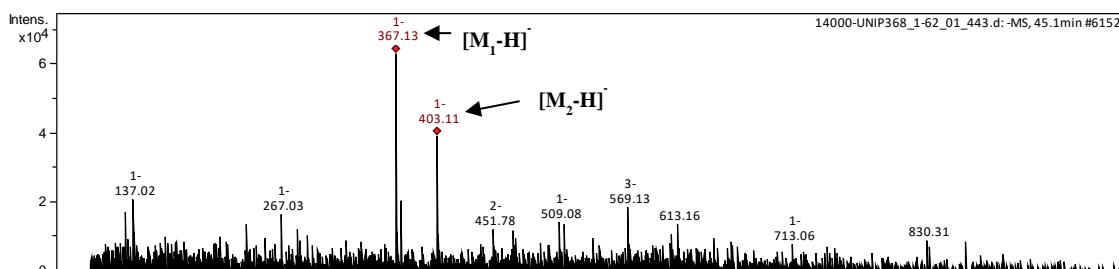


Fonte: DÍAZ, 2016.

O espectro de ESI-massas no modo negativo do sinal (pico) com tempo de retenção de 45,1 min, apresenta o íon molecular  $[M-H]^-$  com  $m/z$  367,13 (figura 37). Posteriormente, o íon  $m/z$  367,13 em  $MS^2$  apresenta o ácido cafeoil-CH<sub>2</sub>-O-quinico,

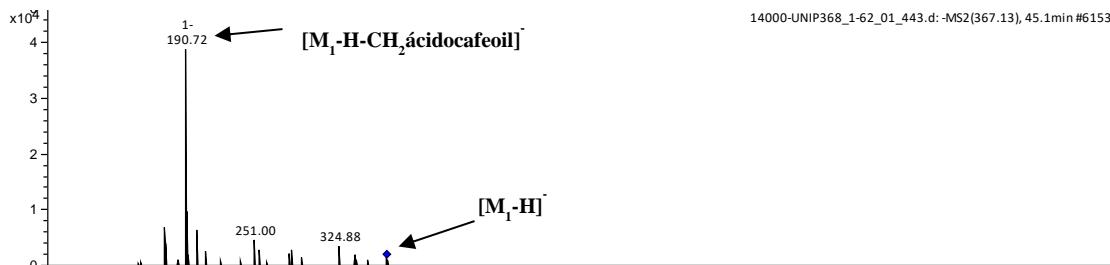
com peso molecular 368, sendo possível verificar na figura 38. (LIAN-WEN; CHUN-YUN; PING et al., 2009).

Figura 37- Espectro de massa ESI<sup>-</sup> no modo negativo da amostra UNIP-368 a 45,1 min, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

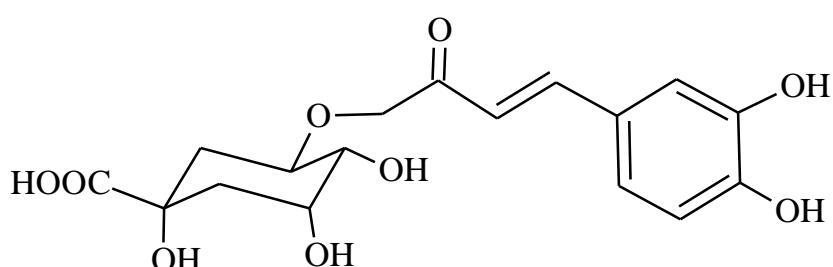
Figura 38 - Espectro de massas no modo negativo de MS<sup>2</sup> de *m/z* 367,13 [M-H]<sup>-</sup> da amostra UNIP-368, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 39 mostra a estrutura molecular do ácido cafeoil-CH<sub>2</sub>-O-quinico.

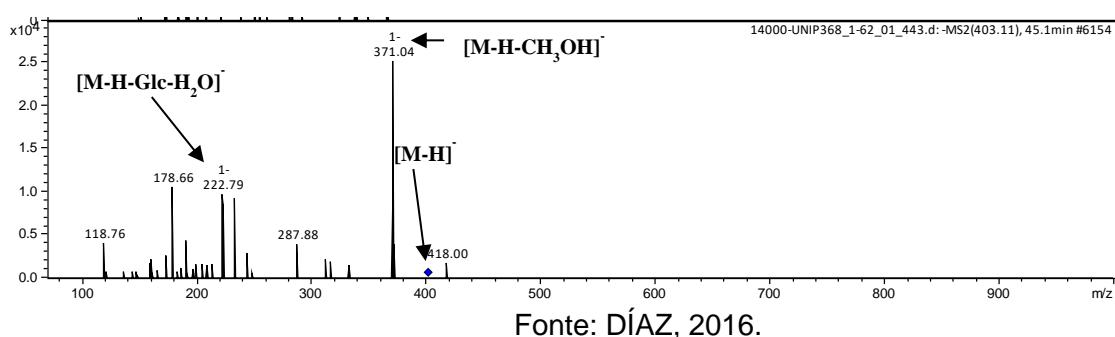
Figura 39 - Estrutura molecular do ácido cafeoil-CH<sub>2</sub>-O-quinico originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

O espectro de ESI-massas no modo negativo apresenta o íon molecular  $[M-H]^-$  com  $m/z$  403,11. Posteriormente, o íon  $m/z$  403,11 apresenta os fragmentos  $m/z$  371,04  $[M-H-CH_3OH]^-$  e  $m/z$  222,79  $[M-H-Glc-H_2O]^-$  que sugerem a presença do iridoide secologanino, sendo possível visualizar na figura 40 (KUCHARSKA; FECKA et al., 2016).

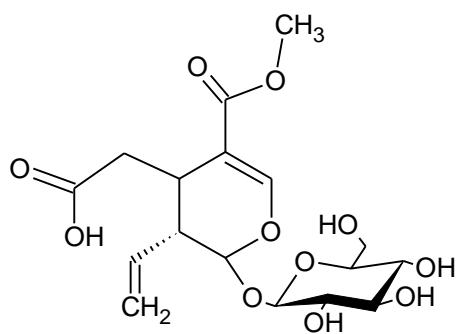
Figura 40 - Espectro de massas no modo negativo de  $MS^2$  de  $m/z$  403,11  $[M-H]^-$  da amostra UNIP-368, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 41 mostra a estrutura molecular do secologanino.

Figura 41 - Estrutura molecular do secologanino. originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.

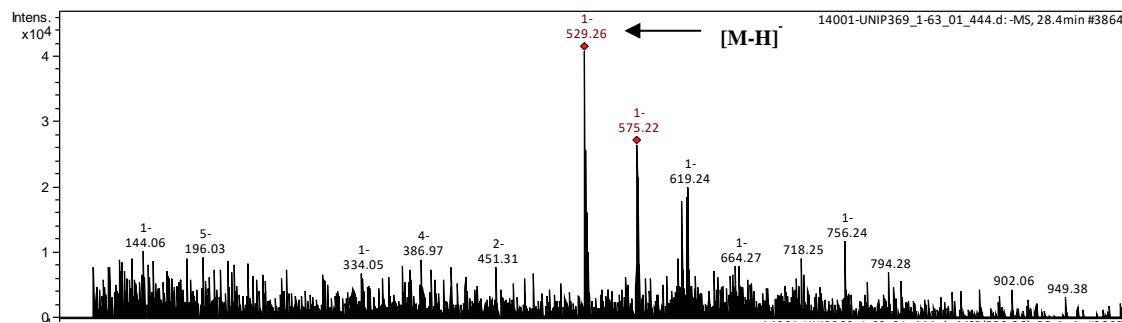


Fonte: DÍAZ, 2016.

O espectro de ESI-massas no modo negativo do sinal (pico) com tempo de retenção de 28,4 min, apresenta o íon molecular  $[M-H]^-$  com  $m/z$  529,26 (figura 42). Posteriormente, o íon  $m/z$  529,26 em  $MS^2$  apresenta o fragmento  $m/z$  513,00  $[M-H-CH_4]^-$ ,  $m/z$  349,02  $[M-H-cafeoil-H_2O]^-$ , sendo possível verificar na figura 43. O espectro

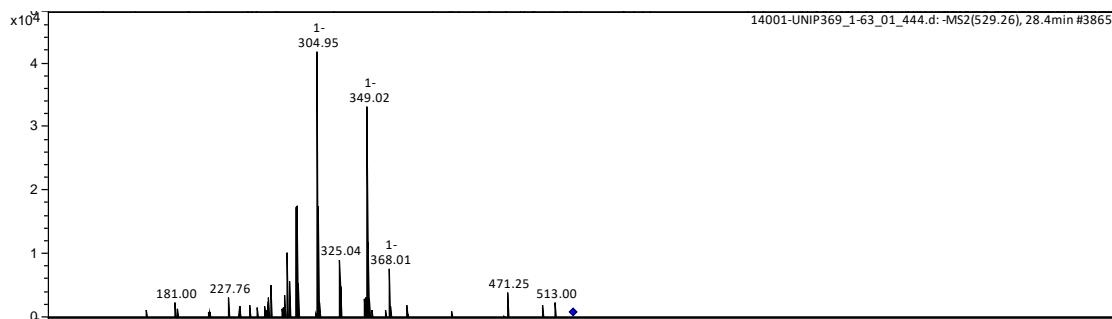
de massas sugere que pode ser do ácido metil dicafeoilquinico (LIAN-WEN; CHUN-YUN; PING et al., 2009).

Figura 42 - Espectro de massa ESI<sup>-</sup> no modo negativo da amostra UNIP-369 a 28,4 min, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

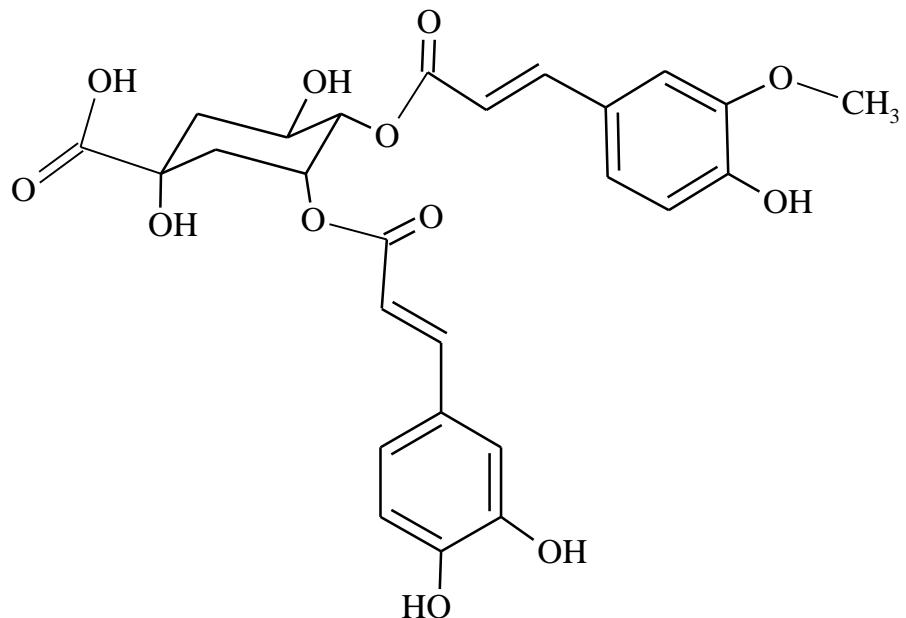
Figura 43 - Espectro de massas no modo negativo de MS<sup>2</sup> de *m/z* 529,26 [M-H]<sup>-</sup> da amostra UNIP-369, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 44 mostra a estrutura molecular do ácido metil dicafeoilquinico.

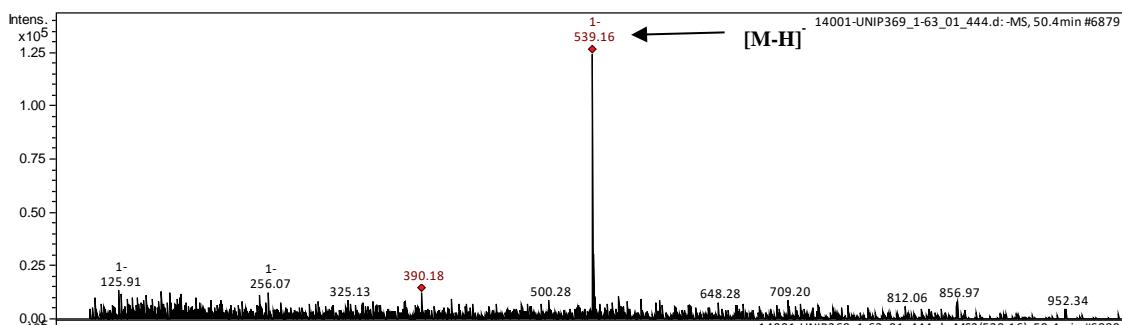
Figura 44 - Estrutura molecular do ácido metil dicafeoilquinico. originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

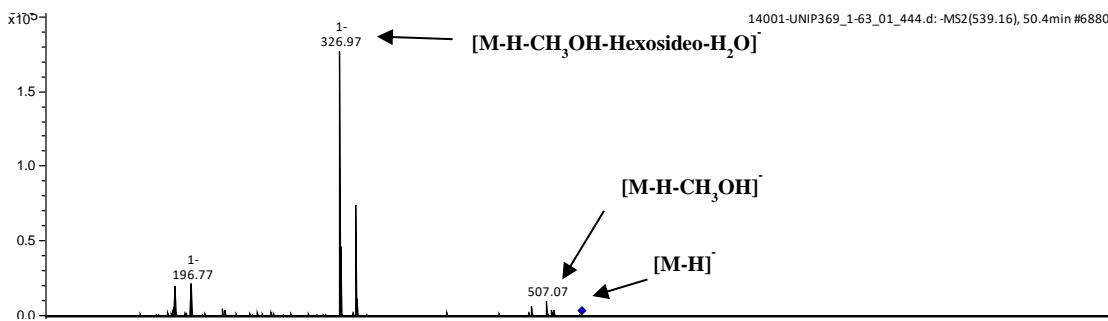
O espectro de ESI-massas no modo negativo do sinal (pico) com tempo de retenção de 50,4 min, mostra a presença de uma molécula com peso de 540, apresenta o íon molecular [M-H]<sup>-</sup> com *m/z* 539 (figura 45). Posteriormente, o íon *m/z* 539 apresenta o fragmento *m/z* 507,07 [M-H-CH<sub>3</sub>OH]<sup>-</sup>, *m/z* 326,97 [M-H-CH<sub>3</sub>OH-Hexosideo-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, sendo possível verificar na figura 46. O espectro de massas sugere ser cafeoil hexosideo (SCHÜTZ; KAMMERER; CARLE et al., 2005).

Figura 45 - Espectro de massa ESI<sup>-</sup> no modo negativo da amostra UNIP-369 a 50,4 min, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*



Fonte: DÍAZ, 2016.

Figura 46 - Espectro de massas no modo negativo de  $MS^2$  de  $m/z$  539,16  $[M-H]^-$  da amostra UNIP-369, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.

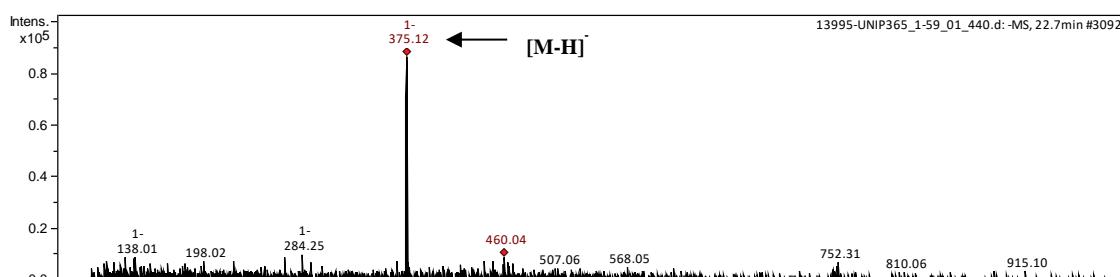


Fonte: DÍAZ, 2016.

Amostra UNIP 365 pelas análises de seus espectros (espectro de massas e de RMN-<sup>1</sup>H) concluem que é a mistura de dois iridoides ácido logânico e loganino, ambos iridoides foram identificados pelas análises do espectro de massas.

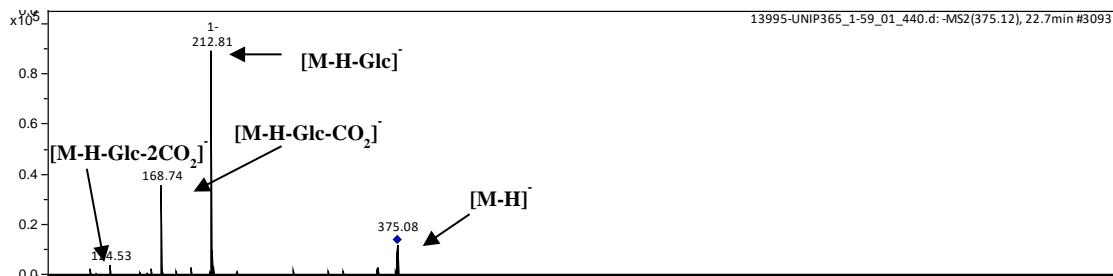
O espectro de ESI-massas no modo negativo do sinal (pico) com tempo de retenção de 22,7 min, apresenta o íon molecular  $[M-H]^-$  com  $m/z$  375,12 (figura 47). Posteriormente, o íon  $m/z$  375,12 em  $MS^2$  apresenta o fragmento  $m/z$  212,81  $[M-H-Glc]^-$  gerado pelo íon pai da perda da molécula neutra de glicose. Os demais fragmentos tais como  $m/z$  168,74  $[M-H-Glc-CO_2]^-$  e 124,53  $[M-H-Glc-2CO_2]^-$  são gerados pela perda sucessiva de dióxido de carbono (figura 48). O espectro de massas sugere a presença do ácido logânico (KUCHARSKA; FECKA, I. 2016).

Figura 47 - Espectro de massa ESI<sup>-</sup> no modo negativo da amostra UNIP-365 a 22,7 min, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*



Fonte: DÍAZ, 2016.

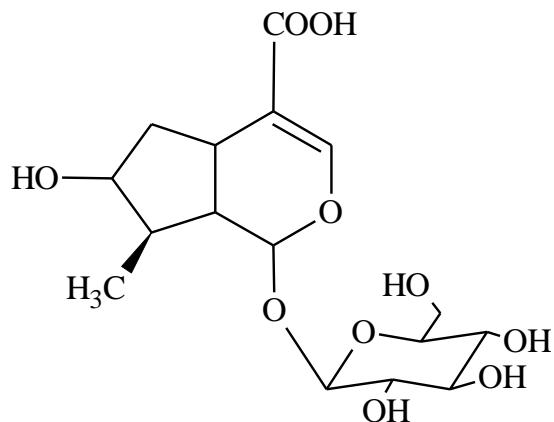
Figura 48- Espectro de massas no modo negativo de  $MS^2$  de  $m/z$  375,12  $[M-H]^-$  da amostra UNIP-365, originado da fração 10%ACN/ $H_2O$ , obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 49 mostra a estrutura molecular do ácido logânico.

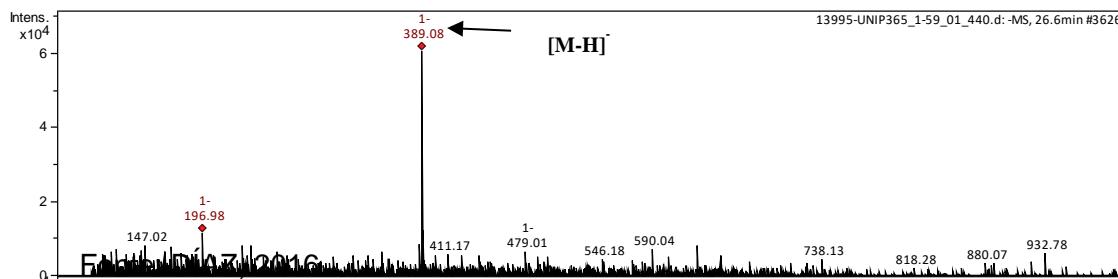
Figura 49 - Estrutura molecular do ácido logânico, originado da fração 10%ACN/ $H_2O$ , obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

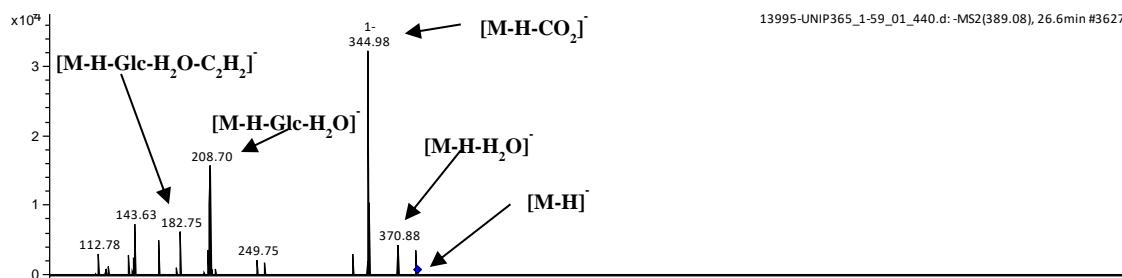
O espectro de ESI-massas no modo negativo do sinal (pico) com tempo de retenção de 26,6 min, apresenta o íon molecular  $[M-H]^-$  com  $m/z$  389,08 (figura 50). Posteriormente o íon  $m/z$  389,08 em  $MS^2$  apresenta o fragmento, eles são gerados pela perda de moléculas neutras como  $m/z$  370,88  $[M-H-H_2O]^-$ , 344,98  $[M-H-CO_2]^-$ , 208,7  $[M-H-Glc-H_2O]^-$ , 182,75  $[M-H-Glc-H_2O-C_2H_2]^-$  (figura 51). O espectro de massas nos sugere a presença do iridoide loganino (KUCHARSKA; FECKA, I. 2016).

Figura 50 - Espectro de massa ESI<sup>-</sup> no modo negativo da amostra UNIP-365 a 26,6 min, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*



Fonte: DÍAZ, 2016.

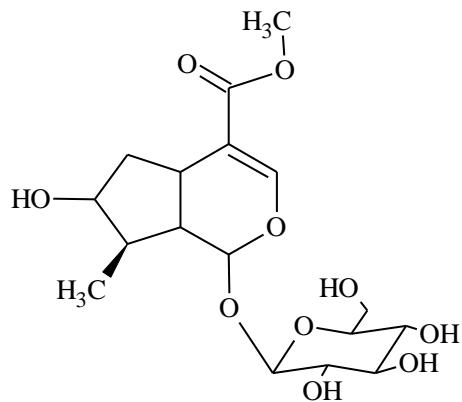
Figura 51 - Espectro de massas no modo negativo de MS<sup>2</sup> de *m/z* 389,08 [M-H]<sup>-</sup> da amostra UNIP-365, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 52 mostra a estrutura molecular do ácido logânico.

Figura 52 - Estrutura molecular do iridoide logânino, originado da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

Todas as frações geradas de hexano e diclorometano da fase de partição  $\text{CHCl}_3$ , foram analisadas em CCD analítica e preparativa, a fim de separar compostos.

Após diversas cromatografias, quarenta e nove frações foram consideradas isoladas, das quais as que continham massa suficiente foram encaminhadas para serem identificadas através da RMN. As demais amostras foram testadas contra a cepa ATCC 25922 por meio da DDA.

As amostras consideradas isoladas e com massa foram encaminhadas para serem analisadas em ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono. Neste estudo foi possível identificar algumas moléculas.

➤ Iridoide loganino

Pelo espectro de RMN- $^1\text{H}$  de 4 mg da amostra UNIP-365, os sinais foram comparados com a literatura e foi confirmada a presença do iridoide loganino (tabela 4) (ABDULLAN; SALIM; AHMAD, 2016; DI;LI; ZU et al., 2011). Análises do espectro de RMN- $^1\text{H}$  para loganino ( $\delta$  ppm, 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

**Tabela 4 - Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de C13 ( $\text{CDCl}_3$ ) para o iridoide loganino isolado do caule de *Microplumeria anomala* (Myristicaceae) e comparação com a literatura.**

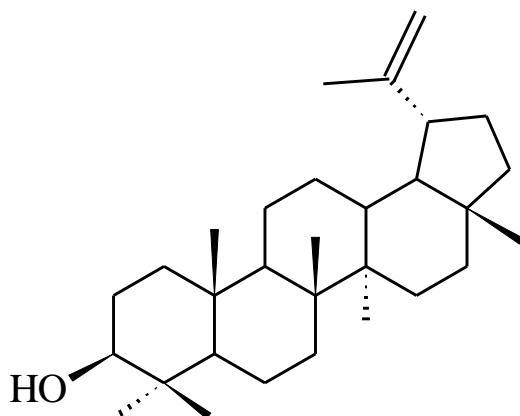
Carbonos	Iridoide loganino	
	Dados obtidos	Dados da literatura*
<b>1C</b>	5,28 d $J=4,77$	5,29 d $J=4,5$
<b>3C</b>	7,39	7,41 s
<b>5C</b>	3,11 m	3,13 m
<b>6<sub>axC</sub></b>	1,63 m	1,64 m
<b>6<sub>eqC</sub></b>	2,22 m	2,25 m
<b>7C</b>	4,04 m	4,06 m
<b>8C</b>	1,87 m	1,89 m
<b>9C</b>	2,02 m	2,04 m
<b>10C</b>	1,09 d $J=7,02$	1,11 d, $J=6,96$
<b>1'C</b>	4,65 d $J=7,93$	4,67 d $J=7,29$
<b>2'C</b>	3,19 m	3,22 m
<b>3'C</b>	3,36 m	3,39 m
<b>4'C</b>	-	3,31 m
<b>5'C</b>	-	3,32 m
<b>6'axC</b>	3,67 m	3,69 dd $J=11,94, 5,7$
<b>6'eqC</b>	3,89 m	3,92 dd $J=11,9, 1,74$
<b>OCH<sub>3</sub></b>	3,68 s	3,70 s

Fonte: ABDULLAN; SALIM; AHMAD, 2016; DI;LI; ZU et al., 2011.

## Lupeol

O lupeol foi identificado em duas frações obtidas, respectivamente, das frações de Hex/CHCl<sub>3</sub> e DCM/CHCl<sub>3</sub>. Em ambas as amostras os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C são idênticos. A figura 53 mostra a estrutura molecular de lupeol.

Figura 53 - Estrutura molecular do lupeol originado das frações de hexano e diclorometano da fase de partição CHCl<sub>3</sub> do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

O espectro de RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) apresenta os sinais característicos de um triterpeno, como dois dbletos em  $\delta$  4.69 e 4,57 com  $J=4.69$  Hz, ambos dbletos correspondem aos hidrogênios ligados ao C-29, um duplo-dbleto em  $\delta$  3,19 com  $J=10,94, 5,14$  Hz correspondente ao H-3. Seis singletos entre  $\delta$  0,76 e 1,035 correspondentes às metilas 23, 24, 25, 26, 27, 28 e um singlet em  $\delta$  1,69 da metila C-30. A tabela 5 mostra a análise da RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) do lupeol.

**Tabela 5 - Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de C13 (CDCL<sub>3</sub>) para o lupeol isolado do caule de *Microplumeria anomala* (Myristicaceae) e comparação com a literatura.**

Carbonos	Lupeol	
	Dados obtidos	Dados da literatura
1C	38,68	38,7
2C	27,42	27,4
3C	78,97	78,9
4C	38,83	38,8
5C	55,27	55,3
6C	18,29	18,3
7C	34,25	34,2
8C	40,79	40,8
9C	50,41	50,4
10C	37,14	37,1
11C	20,90	20,9
12C	25,10	25,1
13C	38,02	38,0
14C	42,80	42,8
15C	27,38	27,4
16C	35,55	35,5
17C	42,97	43,0
18C	48,27	48,0
19C	47,95	47,9
20C	150,93	150,9
21C	29,82	29,8
22C	39,97	40,0
23C	27,96	28,0
24C	15,35	15,4
25C	-	16,1
26C	15,95	15,9
27C	14,52	14,5
28C	17,98	18,0
29C	109,30	109,3
30C	19,28	19,3

Fonte: CURSINO; MESQUITA; MESQUITA, 2009

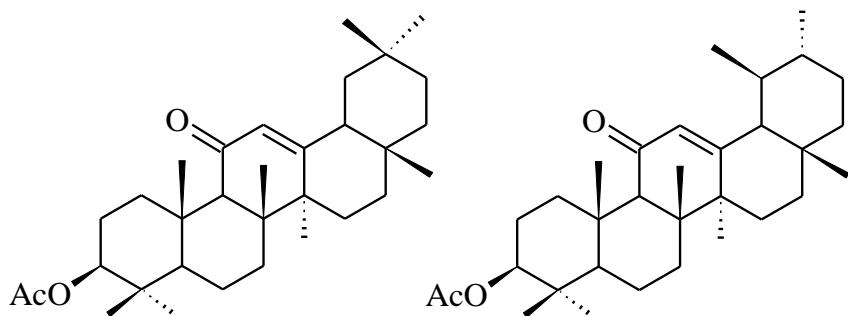
Nas figuras 2 a 5 do anexo 1 mostram os espectros de RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C das amostras de lupeol isoladas da fração de hexano e DCM da fase de partição clorofórmio EB127.

➤ **3-acetil-11-oxo-β-amirina e 3-acetil-11-oxo-α-amirina**

A amostra ganhava a denominação de UNIP 257 e obtinha o peso de 10,1 mg.

A figura 54 mostra a estrutura molecular de 3-acetil-11-oxo-β-amirina e 3-acetil-11-oxo-α-amirina isoladas da fração de hexano da fase de partição clorofórmio do EB127.

Figura 54 - Estrutura molecular de 3-acetil-11-oxo-β-amirina e 3-acetil-11-oxo-α-amirina originado das frações de hexano e diclorometano da fase de partição  $\text{CHCl}_3$  do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

Foi identificada, na amostra UNIP-257, a mistura de 3-acetil-11-oxo-β-amirina e 3-acetil-11-oxo-α-amirina. O espectro de RMN-<sup>1</sup>H ( $\text{CDCl}_3$ ) apresenta os sinais característicos de um esqueleto oleano e ursano acetilado, como os singletos em δ 5,69 e 5,55, cada correspondente ao H-12 do esqueleto ursano e oleano, respectivamente. Um duplo-dubletos em δ 4,52 com  $J = 11,79$  e 4,61 Hz correspondente ao H-3 de ambos esqueletos. Os singletos em δ 2,36 e 2,35 correspondentes ao H-9 do esqueleto ursano e oleano, respectivamente. Um singuleto em δ 2,06 correspondente à metila do acetato. Também estão presentes os 14 singletes entre δ 0,82-1,37 das metilas de ambos compostos e dois dubletos em δ 0,81 e 0,90 com  $J=6$  Hz das metilas ligadas aos C-19 e C-20 do esqueleto ursano. A tabela 6 mostra o espectro de RMN-<sup>13</sup>C ( $\text{CDCl}_3$ ) para 3-acetil-11-oxo-β-amirina:

**Tabela 6 - Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de C13 (CDCl<sub>3</sub>) para 3-acetil-11-oxo-β-amirina e 3-acetil-11-oxo-α-amirina isolados do caule de *Microplumeria anomala* (Myristicaceae) e comparação com a literatura.**

Carbonos	3-acetil-11-oxo-β-amirina	3-acetil-11-oxo-α-amirina		
	Dados obtidos	Dados da literatura	Dados obtidos	Dados da literatura
<b>1C</b>	38,78	38,7	38,86	
<b>2C</b>	27,21	23,4	27,48	
<b>3C</b>	80,64	80,5	80,64	78,8
<b>4C</b>	38,03	38,0	38,03	
<b>5C</b>	54,97	54,9	55,00	
<b>6C</b>	18,49	18,4	18,69	
<b>7C</b>	32,68	32,6	32,78	
<b>8C</b>	43,38	43,3	43,62	
<b>9C</b>	61,66	61,5	61,42	
<b>10C</b>	36,91	36,9	36,78	
<b>11C</b>	200,17	201,4	199,71	199,8
<b>12C</b>	128,04	127,9	130,37	130,4
<b>13C</b>	170,67	170,2	164,99	164,9
<b>14C</b>	45,13	45,3	45,13	
<b>15C</b>	26,42	26,4	26,42	
<b>16C</b>	26,38	26,4	26,38	
<b>17C</b>	32,36	32,3	32,36	
<b>18C</b>	47,59	47,5	58,98	
<b>19C</b>	45,10	45,0	39,26	
<b>20C</b>	30,86	31,0	39,19	
<b>21C</b>	34,42	34,4	30,86	
<b>22C</b>	-	36,4	40,89	
<b>23C</b>	28,04	28,0	28,04	
<b>24C</b>	16,67	16,6	16,54	
<b>25C</b>	16,39	15,7	16,54	
<b>26C</b>	-	17,3	17,45	
<b>27C</b>	23,55	23,5	23,36	
<b>28C</b>	28,74	28,7	28,80	
<b>29C</b>	33,05	33,0	29,55	
<b>30C</b>	24,47	23,5	20,47	
<b>CH<sub>3</sub>-COO</b>	21,29	21,2	21,29	
<b>COO</b>	171,00	170,6	171,00	

Fonte: BARNES; PEREIRA; SCOFIELD et al., 1984; FINGOLO; SANTOS; VINNA et al., 2013.

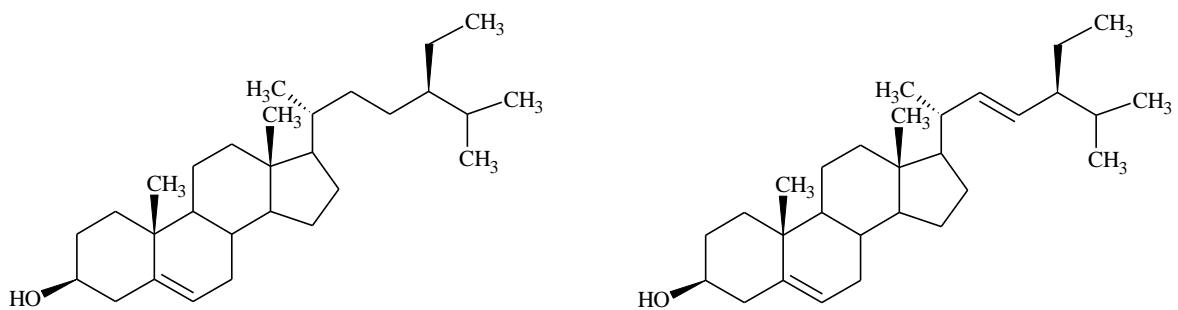
Nas figuras 6 e 7 do anexo1 mostram os espectros de RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C das amostras de 3-acetil-11-oxo-β-amirina e 3-acetil-11-oxo-α-amirina isoladas da fração de hexano e DCM da fase de partição clorofórmio EB127.

➤ **Sitosterol e Estigmasterol**

A amostra ganhava a denominação de UNIP 271 e obtinha o peso de 17,5 mg.

A figura 55 mostra a estrutura molecular de sitosterol e estigmasterol das amostras soladas da fração de hexano da fase de partição clorofórmio do EB127.

Figura 55 - Estrutura molecular de sitosterol e estigmasterol originado das frações de hexano e diclorometano da fase de partição  $\text{CHCl}_3$  do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

Foi identificada na amostra UNIP-271 a mistura dos esteroides sitosterol e estigmasterol. O espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) apresenta os sinais característicos desses esteroides como dois singletos largos em δ 5,36 e 5,35 correspondentes aos H-6 de estigmasterol e sitosterol respectivamente, um duplo-dubleto em δ 5,16 com J=15,22, 8,8 Hz correspondente ao H-23 do estigmasterol, um duplo-dubleto em δ 5,02 com J=15,05, 8,62 Hz, correspondente ao H-22 do estigmasterol. Um multipletos em δ 3,53 correspondente ao H-3 de ambos esteroides. Os sinais correspondentes às metilas dos esteroides estão presentes em δ 0,69-1,26. A tabela 7 mostra o espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) para o sitosterol e estigmasterol.

**Tabela 7 - Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de C13 (CDCL<sub>3</sub>) para sitosterol e estigmasterol isolados do caule de *Microplumeria anomala* (Myristicaceae) e comparação com a literatura.**

Carbonos	Sitosterol		Estigmasterol	
	Dados obtidos	Dados da literatura	Dados obtidos	Dados da literatura
1C	37,23	37,3	37,23	37,4
2C	31,63	31,8	31,44	31,7
3C	71,78	71,9	71,78	71,8
4C	42,28	42,4	42,28	42,4
5C	140,73	140,9	140,73	140,9
6C	121,69	121,8	121,69	121,7
7C	31,88	32,0	31,88	31,9
8C	31,88	32,0	31,88	31,9
9C	50,13	50,3	50,13	50,3
10C	36,16	36,6	36,49	36,6
11C	21,07	21,1	21,07	21,1
12C	39,75	39,9	39,66	39,8
13C	42,19	42,4	42,19	42,4
14C	56,74	56,8	56,85	57,0
15C	24,28	24,3	24,35	24,4
16C	28,23	28,2	28,89	28,9
17C	56,04	56,2	55,93	56,0
18C	11,96	11,9	12,23	12,2
19C	19,38	19,4	19,38	19,4
20C	36,13	36,2	40,47	40,5
21C	19,02	19,1	21,20	21,1
22C	33,93	34,0	138,31	138,4
23C	29,68	29,3	129,25	128,4
24C	50,13	50,3	51,22	51,3
25C	26,06	26,2	31,88	31,9
26C	18,87	18,8	18,97	19,0
27C	19,79	19,8	21,20	21,1
28C	23,04	23,1	25,39	25,4
29C	11,85	11,9	12,02	12,0

Fonte: HOLLAND; DIAKOW; TAYLOR, 1978.

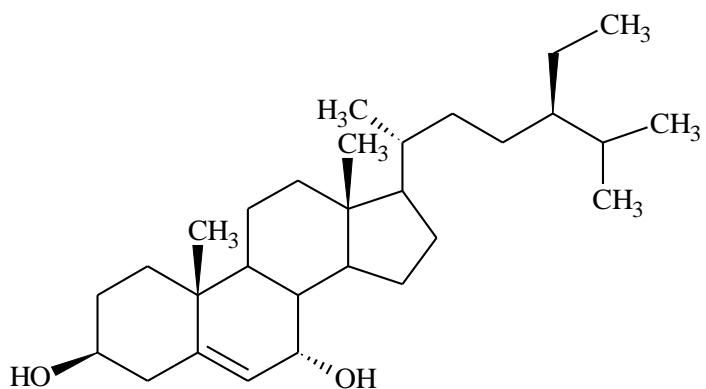
Nas figuras 8 e 9 do anexo 1 mostram os espectros de RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C das amostras de sitosterol e estigmasterol isoladas da fração de hexano e DCM da fase de partição clorofórmio EB127.

➤ **3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-colest-5-eno**

A amostra ganhava a denominação de UNIP 274 e obtinha o peso de 5,3 mg.

A figura 56 mostra a estrutura molecular de 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-colest-5-eno das amostras soladas das frações de hexano e diclorometano da fase de partição clorofórmio do EB127.

Figura 56 - Estrutura molecular de 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-colest-5-eno originado das frações de hexano e diclorometano da fase de partição CHCl<sub>3</sub> do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

Foi identificado na amostra UNIP-274 o esteróide 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-colest-5-eno. O espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) apresenta os seguintes sinais, um doubleto largo em  $\delta$  5,61 com J=5,3 Hz correspondente ao H-6. Um multiplete em  $\delta$  3,59 correspondente ao H-3 e as metilas correspondentes à estrutura proposta estão presentes entre  $\delta$  0,69-1,10. A tabela 8 mostra o espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) de 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-colest-5-eno:

**Tabela 8 - Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de C13 (CDCL<sub>3</sub>) para 3β,7α-dihidroxi-colest-5-eno isolado do caule de *Microplumeria anomala* (Myristicaceae) e comparação com a literatura.**

Carbonos	3β,7α-dihidroxi-colestan-5-eno	
	Dados obtidos	Dados da literatura
1C	37,38	37,5
2C	31,34	31,4
3C	71,33	71,3
4C	42,12	42,2
5C	146,23	146,4
6C	123,84	123,9
7C	65,35	65,4
8C	36,99	37,2
9C	42,26	42,4
10C	37,49	37,6
11C	20,68	20,8
12C	39,15	39,3
13C	42,26	42,3
14C	49,47	49,5
15C	24,28	24,4
16C	28,91	28,3
17C	55,75	56,0
18C	11,79	11,7
19C	18,23	18,3
20C	35,83	35,9
21C	18,89	18,8
22C	36,08	36,3
23C	23,04	23,8
24C	39,15	39,6
25C	28,26	28,1
26C	22,67	22,6
27C	23,04	22,8

Fonte: SMITH, 1978

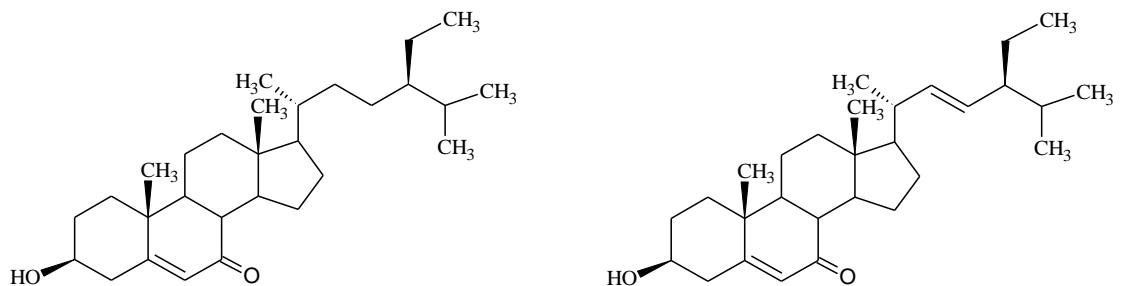
Nas figuras 10 e 11 do anexo 1 mostram os espectros de RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C da amostra de 3β,7α-dihidroxi-colest-5-eno isolado da fração de hexano e DCM da fase de partição clorofórmio EB127.

➤ **3 $\beta$ -hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3 $\beta$ -hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona**

A amostra ganhava a denominação de UNIP 283 e obtinha o peso de 11,5 mg.

A figura 57 mostra a estrutura molecular de 3 $\beta$ -hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3 $\beta$ -hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona das amostras isoladas das frações de hexano e diclorometano da fase de partição clorofórmio do EB127.

Figura 57- Estrutura molecular de 3 $\beta$ -hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3 $\beta$ -hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona originado das frações de hexano e diclorometano da fase de partição  $\text{CHCl}_3$  do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

Foi identificada na amostra UNIP-283 a mistura dos esteroides 3 $\beta$ -hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3 $\beta$ -hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona. O espectro de RMN-<sup>1</sup>H ( $\text{CDCl}_3$ ) apresenta os sinais característicos desses esteroides como  $\delta$  5,69 do H-6 dos dois esteroides. Um duplo-dubletos em  $\delta$  5,18 com  $J=15,26, 8,85$  Hz do H-23 (3 $\beta$ -hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona). Um duplo-dubletos em  $\delta$  5,03 com  $J= 15,16, 8,54$  Hz do H-22 (3 $\beta$ -hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona). Um multipletos em  $\delta$  3,68 do H-3 de ambos esteroides e as metilas dos esteroides estão presentes entre  $\delta$  0,68-1,21. A tabela 9 mostra o espectro de RMN-<sup>13</sup>C para 3 $\beta$ -hidroxi-colest-5-en-7-ona:

**Tabela 9 - Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de C13 (CDCL<sub>3</sub>) para 3β-hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3β-hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona isolados do caule de *Microplumeria anomala* (Myristicaceae) e comparação com a literatura.**

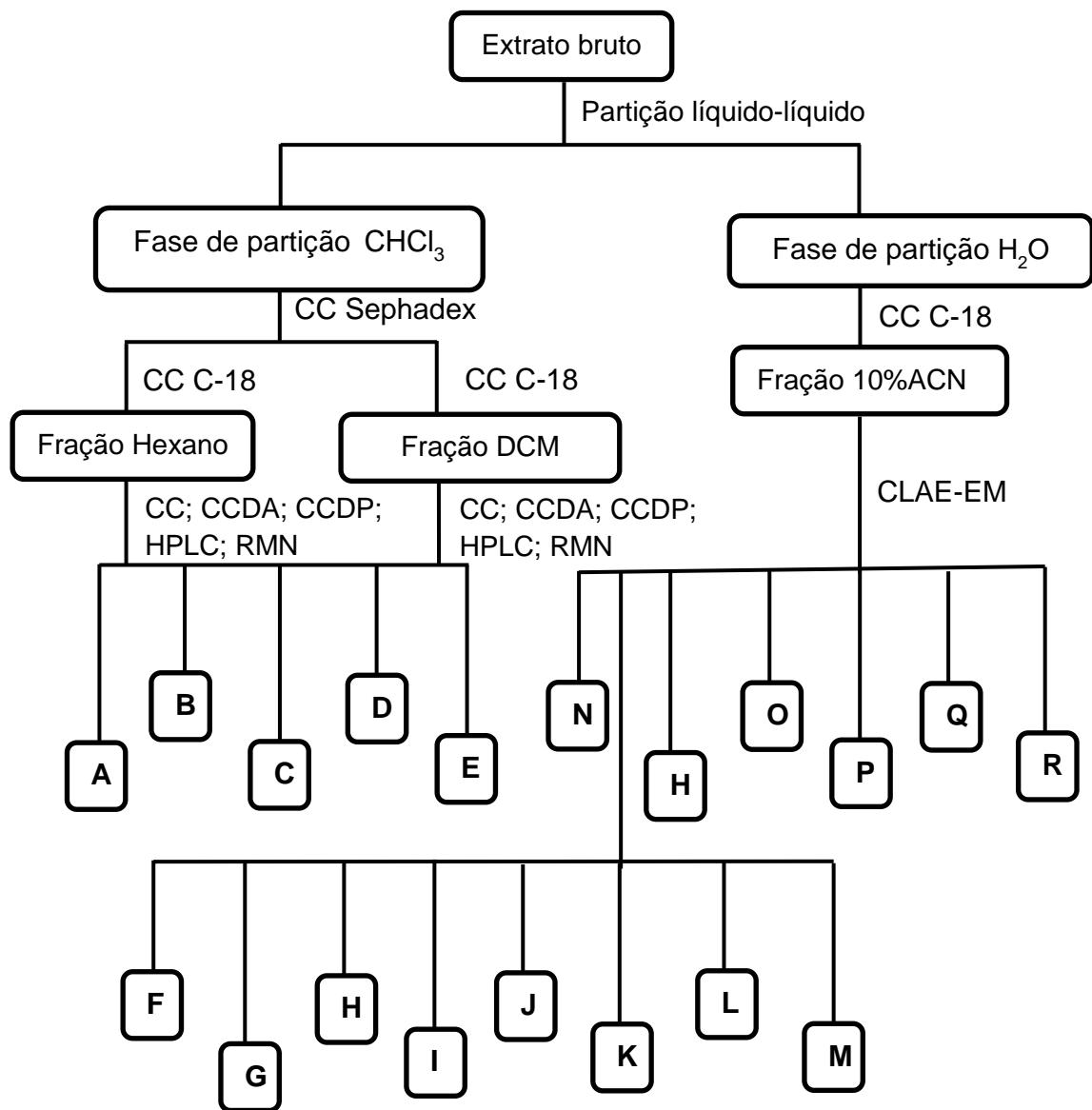
Carbonos	3β-hidroxi-colest-5-en-7-ona	3β-hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona	3β-hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona	3β-hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona
	Dados obtidos	Dados da literatura	Dados obtidos	Dados da literatura
1C	36,34	36,4	36,34	36,3
2C	31,18	31,2	31,18	31,3
3C	70,52	70,4	70,52	70,3
4C	41,79	41,9	41,79	-
5C	165,06	165,3	165,06	164,9
6C	126,11	126,1	126,11	126,2
7C	202,33	202,2	202,33	202,2
8C	45,41	45,4	45,41	45,4
9C	49,94	50,0	49,94	49,92
10C	36,27	38,4	36,27	38,4
11C	21,2	21,2	21,2	21,2
12C	38,68	38,8	38,68	38,7
13C	43,09	43,1	43,09	43,1
14C	49,94	50,0	49,94	49,9
15C	23,04	23,1	23,04	23,04
16C	28,55	28,5	28,55	28,5
17C	54,69	54,8	54,69	54,83
18C	11,96	12,0	11,96	11,94
19C	17,31	17,3	17,31	17,3
20C	36,08	36,1	40,25	40,27
21C	19,03	19,0	20,49	21,04
22C	33,72	34,0	138,08	138,06
23C	26,31	26,3	129,48	129,54
24C	45,80	45,9	45,80	51,23
25C	29,36	29,2	31,9	31,9
26C	18,98	19,8	19,78	19,78
27C	-	19,0	19,03	21,45
28C	22,69	23,1	22,69	25,4
29C	11,96	12,0	12,25	11,94

Fonte: KOVGANKO; KASHKAN; BORISOV et al., 1999; DÍAZ, 1997

Nas figuras 12 e 13 do anexo 1 mostram os espectros de RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C das amostras de 3β-hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3β-hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona isoladas da fração de hexano e DCM da fase de partição clorofórmio EB127.

O esquema, a seguir, mostra de uma forma geral a origem das moléculas identificadas e a suposição da presença de outras encontradas na *Microplumeria anomala*.

Figura 58 – Fluxograma da origem das amostras identificadas extraídas das frações de hexano e diclorometano da fase de partição  $\text{CHCl}_3$  e pressupõe a presença de outras presentes no fração 10%ACN da fase de partição  $\text{H}_2\text{O}$  originados do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.



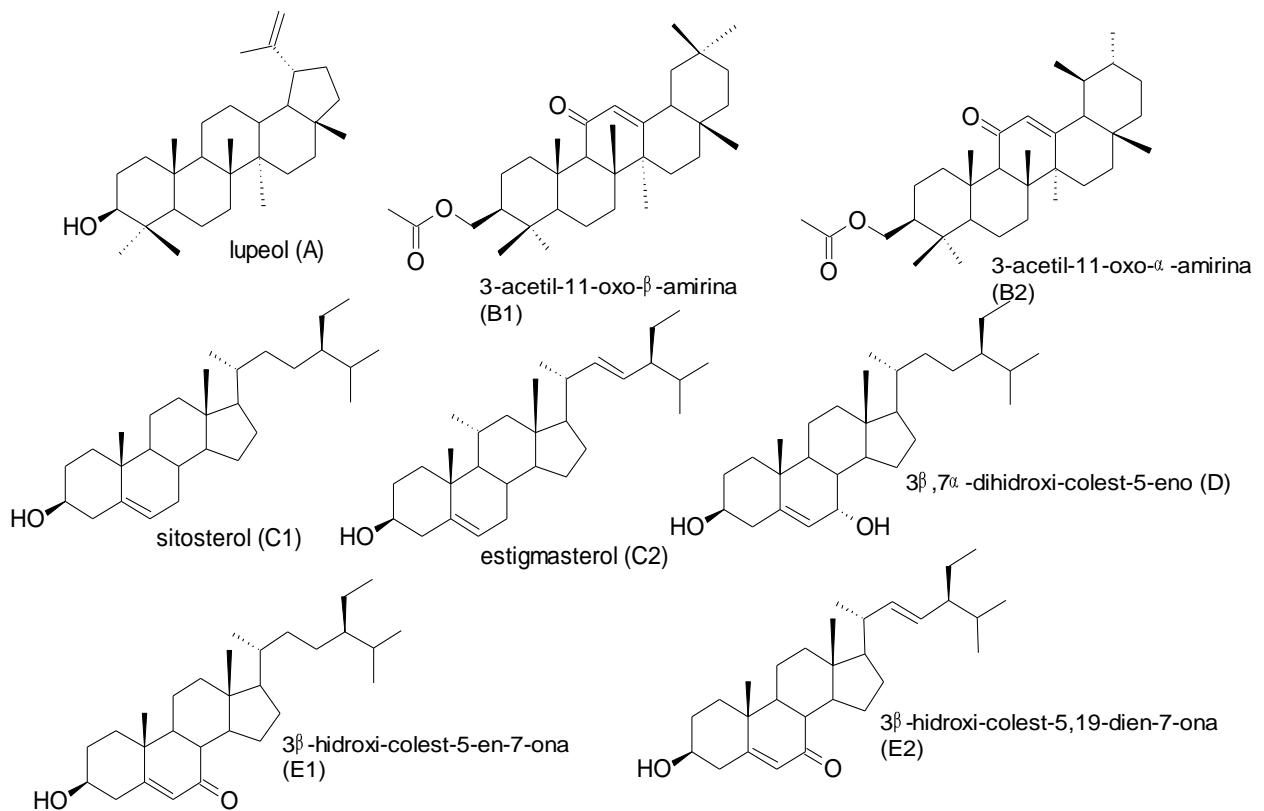
Legenda: A=Lupeol; B=3-acetil-11-oxo- $\beta$ -amirina e 3-acetil-11-oxo- $\alpha$ -amirina; C= Sitosterol e Estigmasterol; D=3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-colest-5-eno; E=3 $\beta$ -hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3 $\beta$ -hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona; F=ácido vanílico glicosilado; G=ácido protocatecuico glicosilado; H=ácido rosmarínico; I=loganino; J=ácido logânico; K=ácido cafeoil-metil-O-quínico; L=ácido metil-dicafeoilquínico; M= secologanino; N=ácido dihidrobenzoico hexosídeo; O=Iridoide com peso molecular 376 (sugerem-se isômeros ácido 8-*epi*-logânico ou ácido logânico); P=Iridoide com peso molecular 390 (sugerem-se isômeros 8-*epi*-loganino ou 7-*epi*-loganino ou loganino);

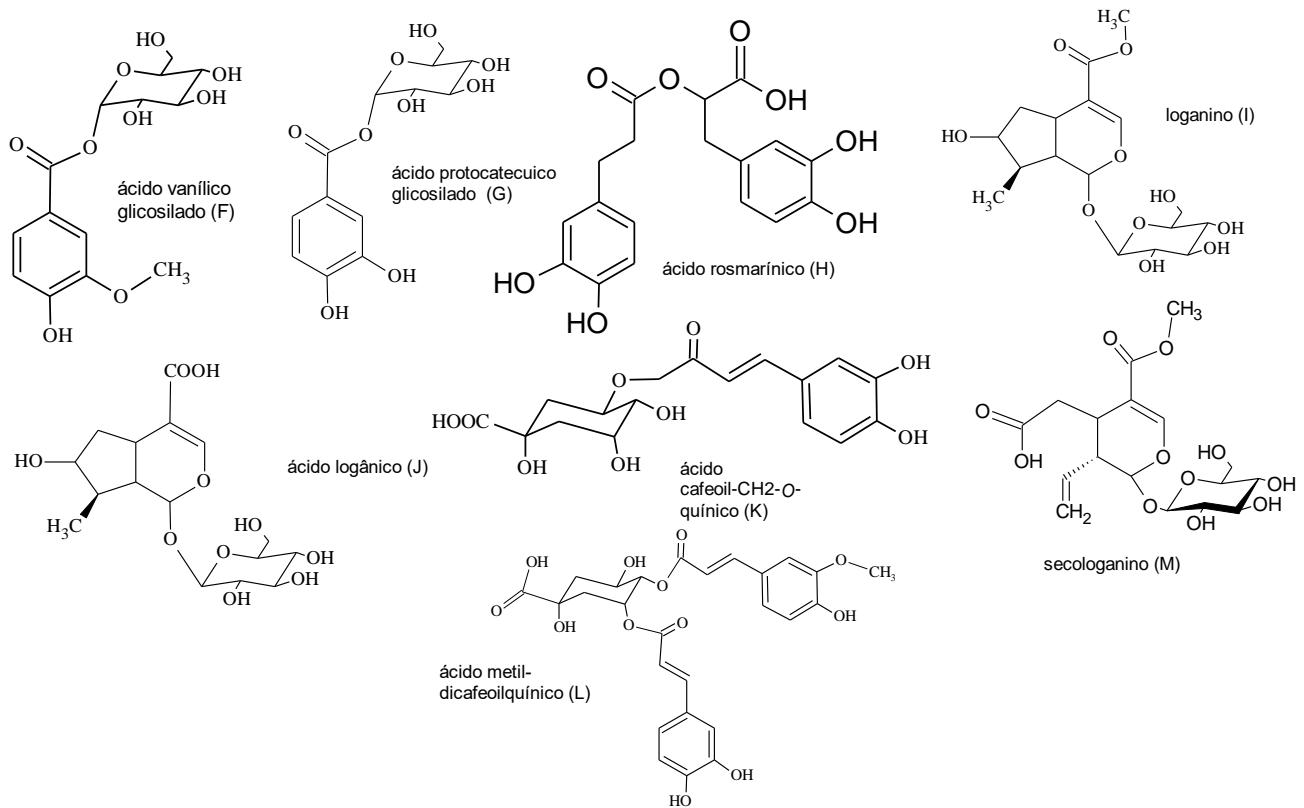
Q=Iridoide com peso molecular 404 (sugerem-se isômeros secologanosídeo-7-metil éster e secologanino); R=ácido 4-O-feruloiquirônico.

Fonte: a autora.

A figura 59 mostra a estrutura molecular das moléculas identificadas no EB127 por meio das técnicas de RMN e CLAE-EM.

Figura 59 - Representação das estruturas moleculares identificadas, das quais foram extraídas do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.

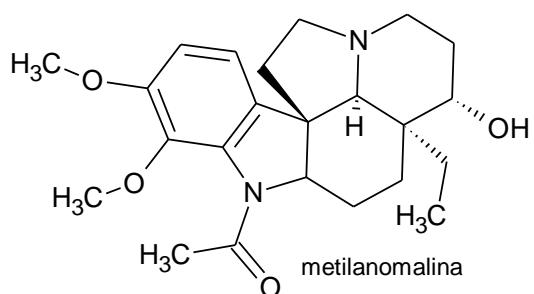
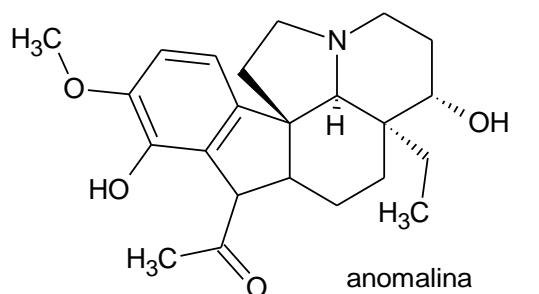
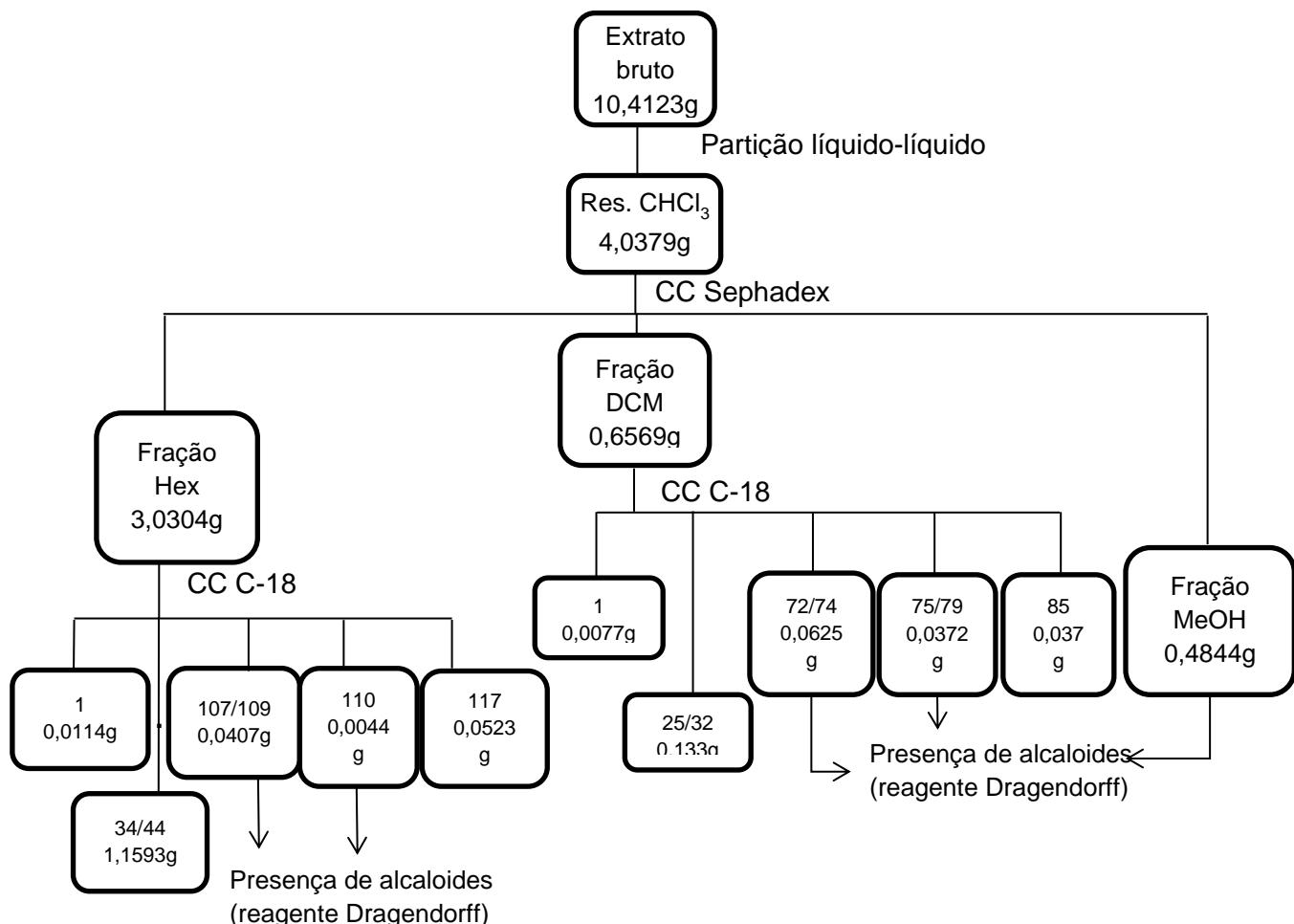




Fonte: DÍAZ, 2016; SUFFREDINI, 2016.

A figura 60 mostra o fluxograma que representa pelo fracionamento a origem dos alcaloides encontrados por meio do teste com o Reagente de Dragendorff.

Figura 60 – Análise da origem dos alcaloides encontrados nas frações de hexano, diclorometano e metanol da fase de partição  $\text{CHCl}_3$  do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.



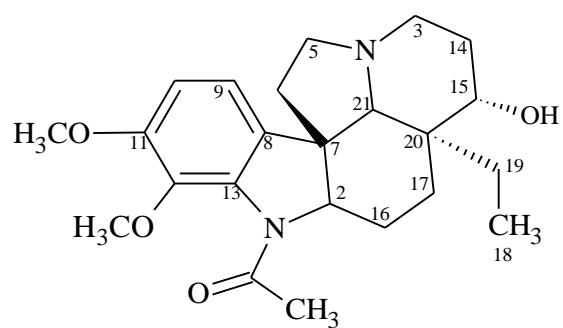
Legenda: CC=cromatografia em coluna; Res. $\text{CHCl}_3$ =fase de partição clorofórmico; Hex=hexano; DCM=diclorometano; MeOH=metanol; CCDA=cromatografia em camada delgada analítica; RMN=resonância magnética nuclear; A=lupeol.

Fonte: a autora e SUFFREDINI, 2016.

➤ **Metilanomalina**

A amostra ganhava a denominação de UNIP 244, isolada das frações de Hex/CHCl<sub>3</sub> e DCM/ CHCl<sub>3</sub>, por meio de cromatografias em colunas, CCD analítica e CCD preparativa. A metilanomalina foi identificada por meio da RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C (tabela 10). A figura 61 representa a estrutura molecular de megilanomalina.

Figura 61 - Estrutura molecular de metilanomalina originado das frações de hexano, diclorometano e metanol da fase de partição CHCl<sub>3</sub> do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

**Tabela 10 - Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de metilanomalina isolada do caule de *Microplumeria anomala* (Myristicaceae). Deslocamento químico de RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz) e RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz) de metilanomalina (δ ppm).**

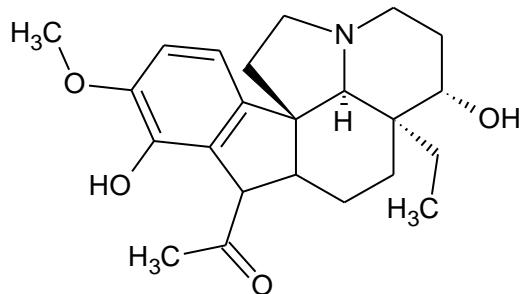
Carbonos	Metilanomalina				
	RMN- <sup>1</sup> H*	RMN- <sup>13</sup> C	DEPT*	RMN- <sup>1</sup> H**	RMN- <sup>13</sup> C
<b>2C</b>	3,93 m	68,71	CH	3,91 dd J= 13,43, 4,88	70,05
<b>3 C</b>	3,16 ddd J=13,43, 13,43, 3,66	34,37	CH <sub>2</sub>	3,15 ddd J= 12,51,12,5 e 3,36	35,89
	4,03 dd J=13,42, 4,88			4,15 dd J=11,29, 6,41	
<b>5 C</b>	2,27 dd J=16,78, 1,22	46,54	CH <sub>2</sub>	2,27 dd J=16,78, 1,27	47,31
	2,5 d J=17,09			2,54 d J=16,78	
<b>6 C</b>	1,51 m	22,30	CH <sub>2</sub>	1,55 m	23,75
	1,54 m			1,59 m	
<b>7 C</b>	-	47,40		-	47,31
<b>8 C</b>	-	138,28		-	138,28
<b>9 C</b>	6,74 d J= 8,24	110,16	CH	6,86 d J=8,24	111,86
<b>10 C</b>	6,67 d J= 8,24	112,44	CH	6,82 d J=8,24	114,68
<b>11 C</b>	-	150,		-	151,28
<b>12C</b>	-	127,55		-	128,79
<b>13C</b>	-	128,85		-	131,28
<b>14C</b>	1,98 m	26,42	CH <sub>2</sub>	1,99 m	27,28
	1,77 m			1,74 m	
<b>15C</b>	3,84 m	67,45	CH	3,76 m	68,00
<b>16C</b>	1,34m	21,17	CH <sub>2</sub>	1,35 m	22,22
	1,53m			1,60 m	
<b>17C</b>	3,93m	23,18	CH <sub>2</sub>	3,91 dd J= 13,43, 4,88	24,18
	1,89 m			1,91 m	
<b>18C</b>	0,69 t	5,91	CH <sub>3</sub>	0,68 t	6,25
<b>19C</b>	1,19 dq J=14,64, 7,63	22,30	CH <sub>2</sub>	1,11 dq J=14,34, 7,63	22,76
	1,49			1,45 m	
<b>20C</b>	-	39,29		-	40,59
<b>21C</b>	4,00 s	59,97	CH	4,09 s	61,81
<b>2(OCH<sub>3</sub>)</b>	3,89s	56,49	CH <sub>3</sub>	3,85 s	57,19
<b>CH<sub>3</sub>CO</b>	2,33s	22,64	CH <sub>3</sub>	2,38s	23,75
<b>CH<sub>3</sub>CO</b>	-	169,48		-	172,40

Fonte: REIS LUZ; DA ROCHA; PORTER et al., 1983.

➤ **Anomalina**

A amostra ganhava a denominação de UNIP 374, isolada das frações de Hex/CHCl<sub>3</sub> e DCM/ CHCl<sub>3</sub>, por meio de cromatografias em colunas, CCD analítica e CCD preparativa. A anomalina foi identificada por meio da RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C (tabela 11). A figura 62 representa a estrutura molecular de anomalina (REIS LUZ; DA ROCHA; PORTER, et al., 1983).

Figura 62 - Estrutura molecular de anomalina originado das frações de hexano, diclorometano e metanol da fase de partição CHCl<sub>3</sub> do extrato bruto de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

**Tabela 11 - Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de anomalina isolada do caule de *Microplumeria anomala* (Myristicaceae). Deslocamentos químicos de anomalina ( $\delta$  em ppm,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500MHz e 125 MHz)**

Carbonos	Anomalina	
	RMN- $^1\text{H}$	RMN- $^{13}\text{C}$
<b>2C</b>	3,72 m	68,63
<b>3C</b>	3,45 m	48,21
	4,46 dd $J= 10,68, 6,41$	
<b>5C</b>	2,41 m 2,45 m	52,06
<b>6C</b>	1,55 1,71 m	38,09
<b>7C</b>	-	51,93
<b>8C</b>	-	138,55
<b>9C</b>	6,88 d $J= 8,24$	114,46
<b>10C</b>	6,83 d $J=7,93$	112,21
<b>11C</b>	-	156,07
<b>12C</b>	-	151,5
<b>13C</b>	-	128,38
<b>14C</b>	1,97 m 2,22 m	28,68
<b>15C</b>	3,75 m	68,41
<b>16C</b>	1,499 m 1,93 m	21,39
<b>17C</b>	2,15 m 3,51 m	24,31
<b>18C</b>	0,701 t $J=7,32$	6,11
<b>19C</b>	1,175 dq $J=14,66, 7,32$ 1,599 m	35,29
<b>20C</b>		42,09
<b>21C</b>	3,94 s	66,04
<b>OCH<sub>3</sub></b>	3,84	57,21
<b>CH<sub>3</sub>CO</b>	2,38	22,78
<b>CH<sub>3</sub>CO</b>		172,24

Fonte: REIS LUZ; DA ROCHA; PORTER et al., 1983; DÍAZ, 2016.

Nas figuras 14 e 15 do anexo 1 mostram os espectros de RMN- $^1\text{H}$  e RMN- $^{13}\text{C}$  das amostras de anomalina isoladas da fração de hexano, DCM e metanol da fase de partição clorofórmio EB127.

### 5.1.3 Resultados da análise química das frações de alcaloides totais de *Microplumeria anomala*

#### 5.1.3.1 Alcaloides totais obtidos pelo meio alcalino a partir da planta (AT2267)

A extração de alcaloides totais a partir da planta iniciou-se pelo método básico. Posteriormente, foi realizada cromatografia em coluna sendo geradas seis frações. Tais frações foram testadas a com reagente de Dragendorff para verificar a eficácia da extração. A fração de 7% mostrou-se mais concentrada, e foi necessário realizar cromatografia em coluna da mesma (tabela 12).

**Tabela 12 - Rendimentos da fração de alcaloides totais (AT2267) obtida do caule de *Microplumeria anomala* e de suas frações.**

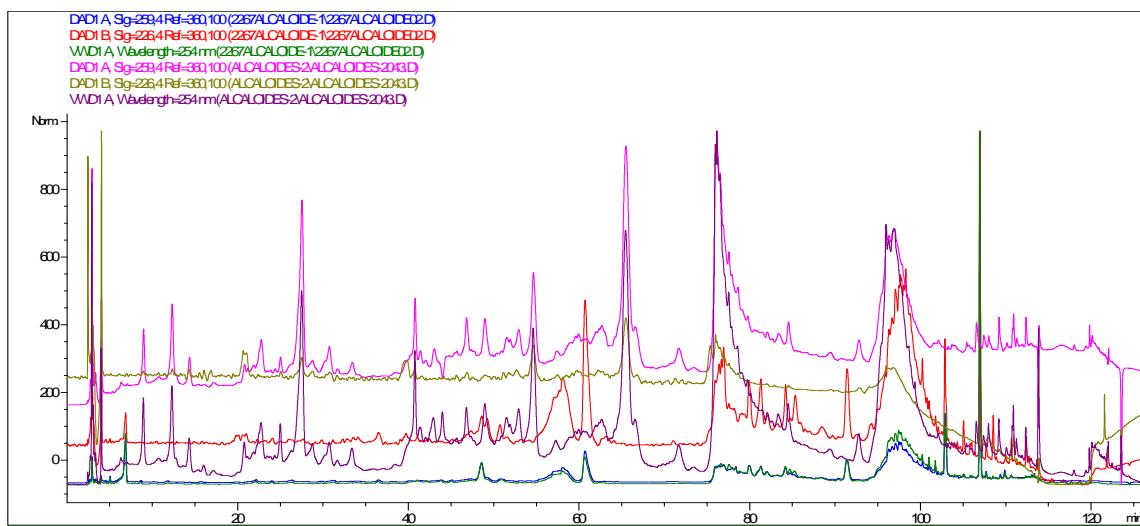
Caule de <i>Microplumeria anomala</i>	1.000 g	Rendimento (%)
AT2267	19,677 g	1,97%
7%ACN/AT2267	9,959 g	50,61%
11%ACN/AT2267	0,725 g	3,68%
15%ACN/AT2267	0,601 g	3,05%
25%ACN/AT2267	1,71 g	8,69%
50%ACN/AT2267	2,19 g	11,13%
MeOH/AT2267	0	0
Fracionamento da fração 7%ACN/AT2267 (4,06 g)		
11%ACN/7%ACN/AT2267	0,0651 g	1,60%
15%ACN/7%ACN/AT2267	0,057 g	1,40%
25%ACN/7%ACN/AT2267	0,280 g	6,90%
50%ACN/7%ACN/AT2267	0,776 g	19,11%

Fonte: a autora; SUFFREDINI, 2016.

De uma forma comparativa, foi feita uma análise do perfil químico por CLAE analítica das amostras AT2267 e EB127.

Ambas as amostras foram cromatografadas, a fim de que os perfis cromatográficos fossem comparados. Os extratos foram submetidos à análise cromatográfica por CLAE analítico e os perfis foram comparados. As condições cromatográficas para ambas as corridas foram as seguintes  $T_{0 \rightarrow 16\text{min}}$  7% ACN,  $T_{16 \rightarrow 17\text{min}}$  11% ACN,  $T_{17 \rightarrow 35\text{min}}$  11% ACN,  $T_{35 \rightarrow 36\text{min}}$  15% ACN,  $T_{36 \rightarrow 71\text{min}}$  15% ACN,  $T_{71 \rightarrow 72\text{min}}$  25%ACN,  $T_{72 \rightarrow 90\text{min}}$  25%ACN,  $T_{90 \rightarrow 111\text{min}}$  100%ACN,  $T_{111 \rightarrow 116\text{min}}$  100%ACN,  $T_{116 \rightarrow 126\text{min}}$  7%ACN. A figura 63 mostra o cromatograma representando a comparação dos perfis cromatográficos de AT2267 e EB127.

Figura 63 - Comparação dos perfis cromatográficos de AT2267 (azul, vermelho e verde escuro), alcaloides totais obtidos do caule de *Microplumeria anomala* pelo método alcalino e de EB127(rosa, verde claro e lilás), extrato bruto obtido do caule da mesma espécie. Os comprimentos de onda selecionados foram 259, 226 e 254 nm.



Fonte: DÍAZ, 2016.

#### 5.1.3.2 Alcaloides totais obtidos pelo meio ácido a partir da planta (AT2268)

Essa fração de alcaloides totais só apresentou resultados biológicos.

#### 5.1.3.3 Alcaloides totais obtidos pelo meio ácido a partir do EB127

A fração de alcaloides totais obtida pelo método ácido a partir do EB127, de *M. anomala*, apresentaram rendimento conforme descrito na tabela 13.

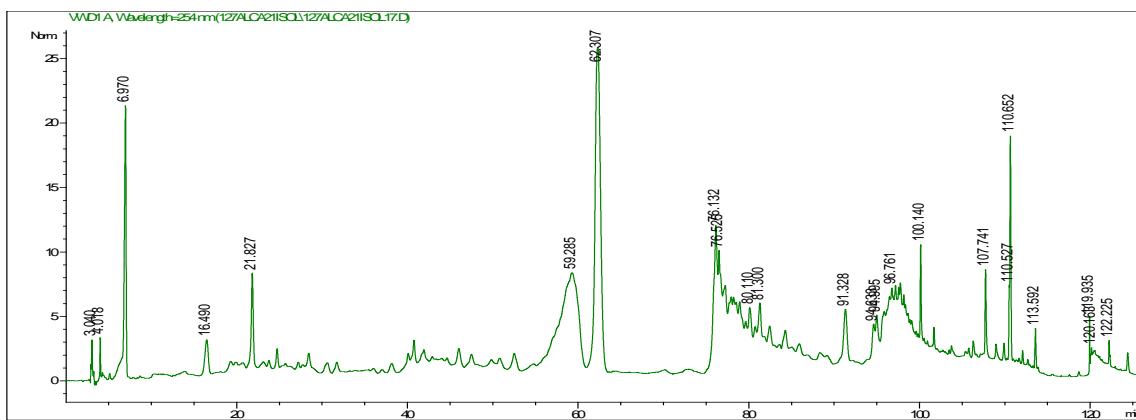
**Tabela 13 - Rendimentos obtidos da extração de alcaloides totais a partir do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala* método ácido e de suas frações.**

Extrato bruto	5000 mg	Rendimento (%)
Torta obtida da extração de alcaloides totais a partir do EB127	1640,2 mg	32,80%
Hexano 1 de fase de partição do EB127	16,5 mg	0,33%
Hexano 2 de fase de partição do EB127	26,8 mg	0,54%
Alcaloides totais do EB	404,5 mg	8,09%

Fonte: a autora; SUFFREDINI, 2016.

Ao término desta etapa, 1,0 mg da amostra de alcaloides totais do EB127 foi pesado para ser avaliado por CLAE analítico com as seguintes condições cromatográficas:  $T_{0 \rightarrow 16\text{min}}$  7% ACN,  $T_{16 \rightarrow 17\text{min}}$  11% ACN,  $T_{17 \rightarrow 35\text{min}}$  11% ACN,  $T_{35 \rightarrow 36\text{min}}$  15% ACN,  $T_{36 \rightarrow 71\text{min}}$  15% ACN,  $T_{71 \rightarrow 72\text{min}}$  25%ACN,  $T_{72 \rightarrow 90\text{min}}$  25%ACN,  $T_{90 \rightarrow 111\text{min}}$  100%ACN,  $T_{111 \rightarrow 116\text{min}}$  100%ACN,  $T_{116 \rightarrow 126\text{min}}$  7%ACN, amostra de alcaloides totais está na concentração de 0,5 mg/mL. A figura 64 representa o cromatograma que demonstra a presença dos alcaloides totais do EB127.

Figura 64 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência dos alcaloides totais (AT2268) extraídos do caule do extrato bruto de *Microplumeria anomala* método ácido.



Fonte: Díaz, 2016.

Pela análise do espectro de massas da amostra de alcaloides totais de EB127, verifica-se que o alcaloide majoritário é a anomalina, cujo peso molecular é 386, com

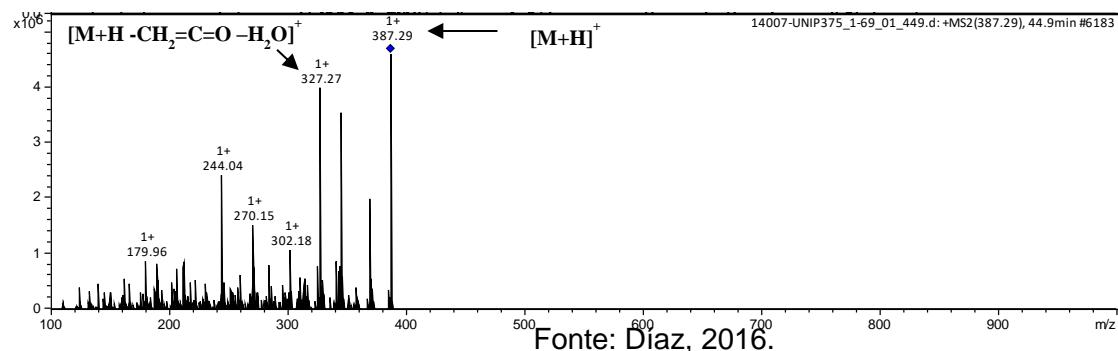
íon molecular no modo positivo é  $[M+H]^+$   $m/z$  387 (figura 65) e cujo fragmento característico é  $m/z$  327,27, que é gerado pela perda de moléculas neutras  $[M+H-CH_2=C=O - H_2O]^+$  (figura 66) (REIS LUZ; DA ROCHA; PORTER et al., 1983). A figura 67 mostra os cromatoíons no modo positivo dos alcaloides totais de EB127 obtido pelo meio ácido,

Figura 65 - Espectro de massa ESI<sup>+</sup> no modo positivo da amostra ade alcaloides totais do EB127 meio ácido a 44,9 min, originado da fração Hexano, diclorometano e metanol da fase de partição  $CHCl_3$ , obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*



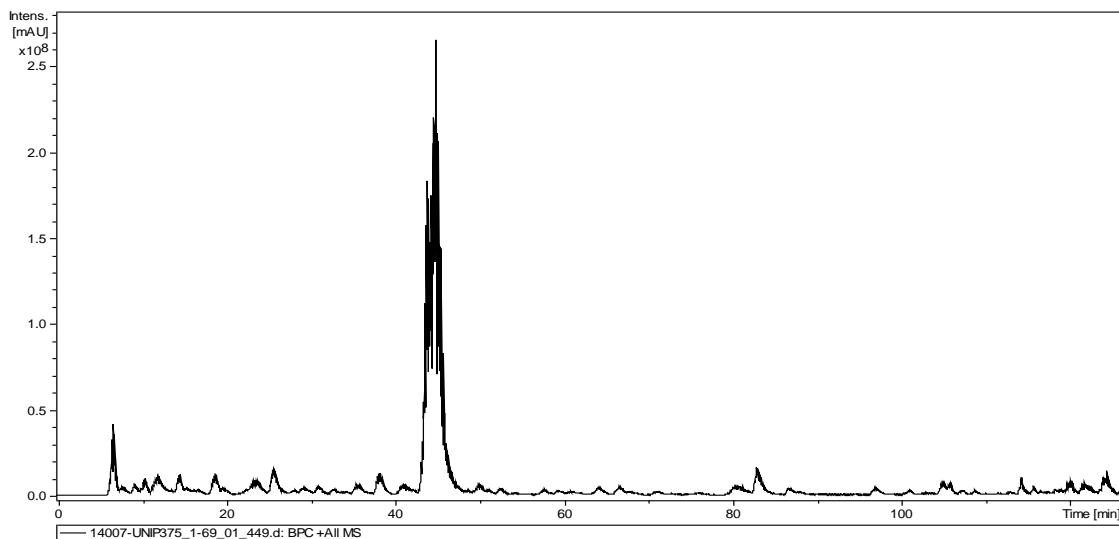
Fonte: Díaz, 2016.

Figura 66 - Espectro de massas no modo positivo de  $MS^2$  de  $m/z$  387,29  $[M+H]^+$  da amostra de alcaloides totais de EB127 meio ácido, originado da fração Hexano, diclorometano e metanol da fase de partição  $CHCl_3$ , obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*



Fonte: Díaz, 2016.

Figura 67 - Cromatoíons no modo positivo da amostra de alcaloides totais de EB127 obtido pelo meio ácido, originado da fração Hexano, diclorometano e metanol da fase de partição  $\text{CHCl}_3$ , obtida do fracionamento do extrato bruto EB127, de *Microplumeria anomala*



Fonte: Díaz, 2016.

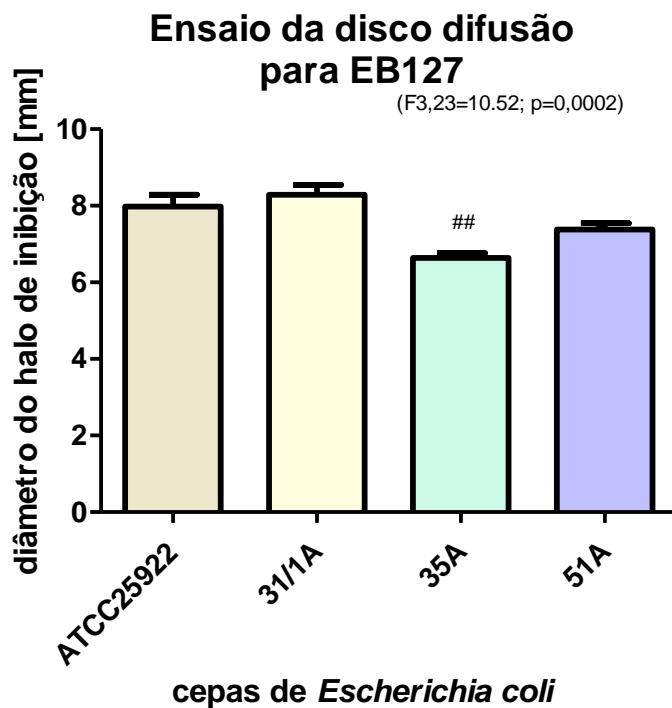
## 5.1.4 Resultados da análise biológica

### 5.1.4.1 Resultados da análise antimicrobiana

#### 5.1.4.1.1 Resultados da análise antimicrobiana por meio da disco difusão em ágar

Na figura 68 estão representados os resultados referentes à atividade antimicrobiana por meio da DDA do EB127 contra as quatro cepas de *E. coli* estudadas. Nessa figura, é possível avaliar as diferenças estatísticas através da análise de variância do tipo ANOVA de uma entrada, com análise posterior de Dunnett.

Figura 68 - Resultados obtidos do ensaio da disco difusão em ágar, no qual o EB127 obtido de *Microplumeria anomala* foi testado contra quatro cepas de *Escherichia coli*. Diferenças estatísticas foram obtidas a partir de análise de variância do tipo ANOVA de uma entrada, com análise posterior de Dunnett. Significância  $p<0.05$ .



Fonte: a autora; SUFFREDINI, 2016.

Segundo os resultados observados, a bactéria 35A foi menos sensível à ação antibacteriana do EB127, enquanto as outras bactérias apresentaram um grau de sensibilidade semelhante à ação de EB127 ( $F_{3,23}=10.52$ ;  $p=0,0002$ ).

As nove frações geradas das fases de partição foram testadas no modelo da DDA contra as quatro cepas de *E. coli*. Na tabela 14, é possível observar os dados obtidos da análise antimicrobiana, segundo o modelo de disco difusão em ágar das frações de EB127 por meio da presença dos halos de inibição de crescimento contra as quatro cepas de *E. coli*.

**Tabela 14 - Avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas do EB127 por, contra as bactérias *Escherichia coli* ATCC25922, *E. coli* 31/1A, *E. coli* 35A e *E. coli* 51A no modelo da disco difusão em ágar.**

	ATCC25922	31/1A	35A	51A
<b>Hex resCHCl<sub>3</sub></b>	-	H=7,65mm V=7,63mm	H=7,7mm V=7,8mm	-
<b>DCM resCHCl<sub>3</sub></b>	-	H=7,63mm V=7,26mm	-	-
<b>MeOH resCHCl<sub>3</sub></b>	-	H=7,09mm V=6,75mm	-	-
<b>10%ACN resBuOH</b>	-	H=6,97mm V=7,33mm	-	-
<b>50%ACN resBuOH</b>	X	X	X	X
<b>MeOH resBuOH</b>	-	-	-	-
<b>10%ACN resH<sub>2</sub>O</b>	H=8,5mm V=9mm	H=7,48mm V=7,77mm	-	H=7,5mm V=7,86mm
<b>50%ACN resH<sub>2</sub>O</b>	-	H=6,87mm V=7,38mm	-	-
<b>MeOH resH<sub>2</sub>O</b>	X	X	X	X

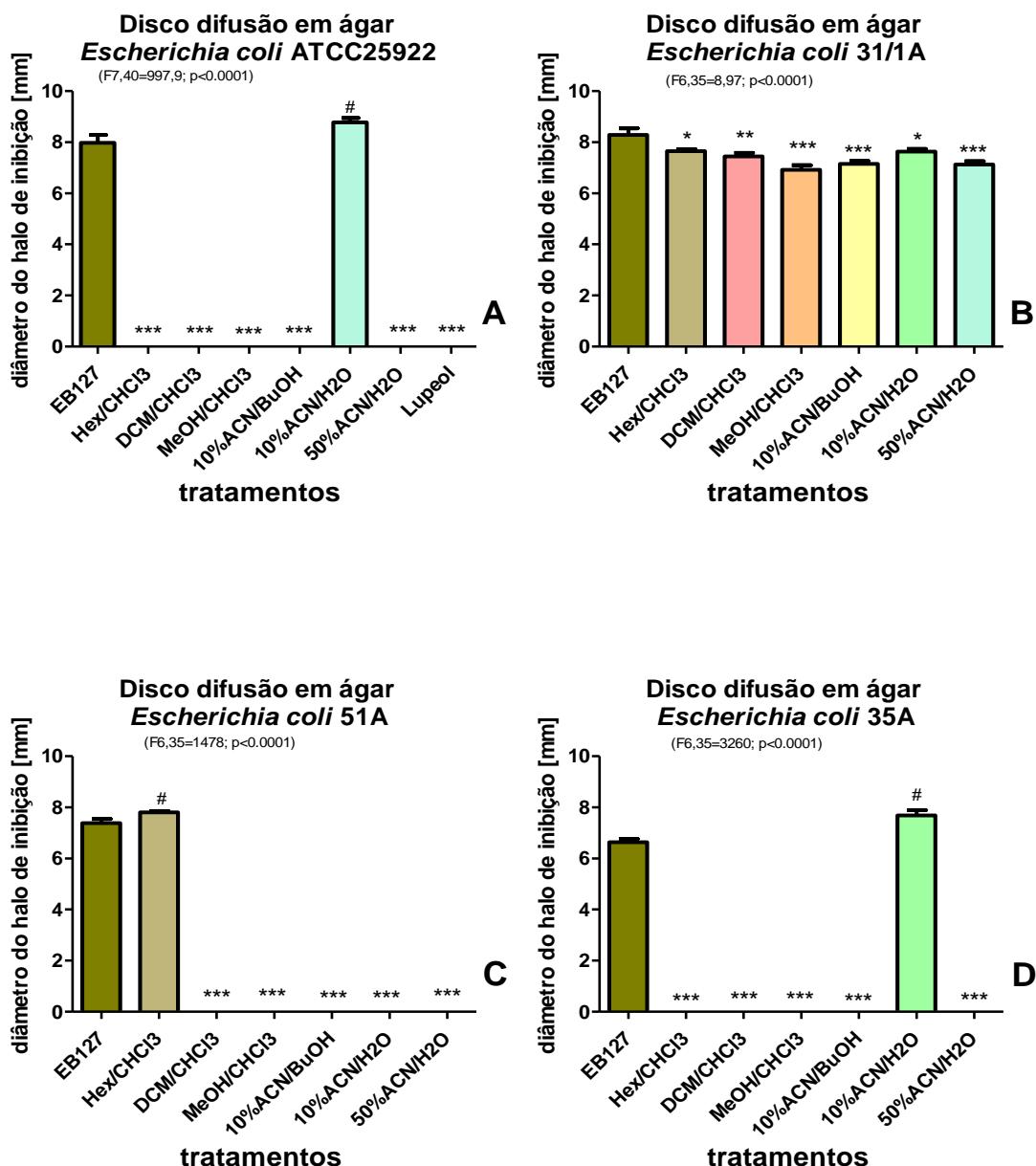
Legenda: CHCl<sub>3</sub>=clorofórmico, BuOH=butanol, H<sub>2</sub>O=aquoso, Hex.=hexano, DCM= diclorometano, MeOH=metanol, ANC=acetonitrila, - = houve crescimento bacteriano, H=medida do halo de inibição na horizontal, V= medida do halo de inibição na vertical, X=não foi testado devido a baixa quantidade de massa.

Fonte: a autora.

EB127 apresentou atividade antibacteriana contra a cepa referência de *E. coli*, ATCC25922, enquanto todas as frações testadas, com exceção da fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O, não apresentaram efeito algum ( $F_{7,40}=997,9$ ;  $p<0.0001$ ). Em relação à cepa 31/1A (virulenta e resistente), EB127 também apresentou atividade, enquanto as frações apresentaram diferentes graus de atividade antibacteriana, embora menor do que a observada para EB127. A fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O apresentou atividade mais significativa, embora menor do que EB127 ( $F_{6,35}=8,97$ ;  $p<0.0001$ ). A cepa de *E.coli* 51A (virulenta e não resistente) foi sensível à ação do EB127 e à fração Hex/CHCl<sub>3</sub> ( $F_{6,35}=1478$ ;  $p<0.0001$ ), ao passo que as outras frações testadas não apresentaram atividade antibacteriana. Os resultados relativos à atividade antibacteriana dos extratos e frações contra a bactéria *E. coli* 35A (não virulenta e resistente) demonstraram que tanto o EB127 quanto a fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O foram significativamente ativos, enquanto as outras frações não demonstraram atividade ( $F_{6,35}=3260$ ;  $p<0.0001$ ).

A figura 69 mostra os testes de DDA realizado com o EB127 e suas frações contra as quatro cepas de *E. coli*, que foram avaliadas por análise de variância ANOVA de uma entrada, com teste posterior de Dunnet e nível de significância de  $\alpha<0,05$ .

Figura 69 - Resultados obtidos da análise antibacteriana de EB127 e suas frações frente a cepas de *Escherichia coli*, no modelo de disco difusão em ágar. Resultados obtidos por análise de variância do tipo ANOVA de uma entrada, com análise posterior de Dunnet. Significância  $\alpha<0.05$ .

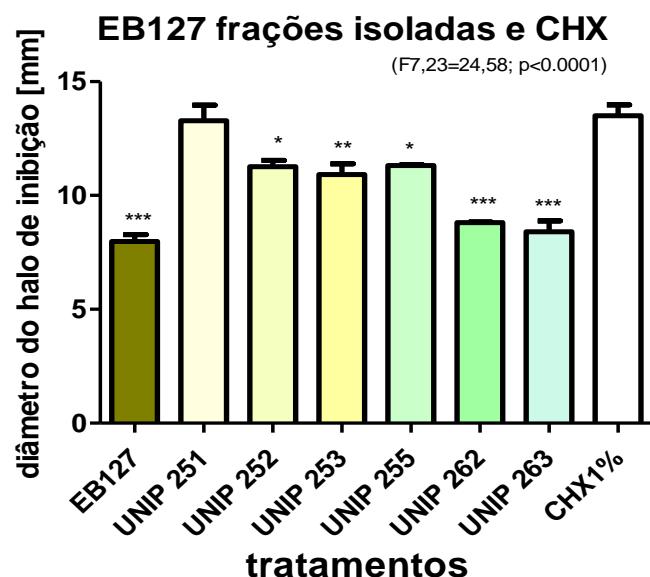


Fonte: a autora; SUFFREDINI, 2016.

A partir da fração de Hex/CHCl<sub>3</sub>, foram geradas 117 novas frações e a fração de DCM/CHCl<sub>3</sub> gerou 85 novas frações. Essas novas frações foram analisadas em CCDA, foram reunidas segundo semelhança cromatográfica gerando 49 amostras. Desses 49, as que apresentaram massa suficiente, foram encaminhadas para análise por RMN, algumas apresentaram moléculas já mencionadas anteriormente. As amostras que apresentaram pouca massa, denominadas de UNIP251, UNIP252, UNIP253, UNIP255, UNIP263 e UNIP263, mais clorexidina 1%, foram submetidas ao ensaio da disco difusão em ágar, em unicata (gerando duas medidas de halo de inibição de crescimento), contra a cepa ATCC25922, por meio de variância ANOVA de uma entrada, com teste posterior de Dunnet e significância de  $\alpha<0.05$

Após o ensaio, seis amostras apresentaram tendência de atividade antibacteriana por terem formado halos de inibição de diâmetros tão extensos quanto os apresentados pela clorexidina 1%, que foi testada em conjunto como uma substância de referência (figura 70) As amostras são apresentadas segundo gradiente crescente de atividade antibacteriana: UNIP252 = UNIP255 > UNIP253 > UNIP262 e UNIP263 ( $F_{7,16}=24,58$ ;  $p<0.0001$ ).

Figura 70 - Resultados obtidos da análise antibacteriana de EB127, seis amostras isoladas e clorexidina frente a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, no modelo de disco difusão em ágar. Resultados obtidos por análise de variância do tipo ANOVA de uma entrada, com análise posterior de Dunnet. Significância  $\alpha<0.05$ .



Fonte: a autora; SUFFREDINI, 2016.

#### 5.1.4.1.2 Resultados da análise antimicrobiana por meio da microdiluição em caldo

EB127, obtido do caule de *M. anomala*, foi testado no modelo da microdiluição em caldo (MDC) para determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e bactericidas mínimas (CBM) contra bactérias preparadas em diferentes concentrações.

A tabela 15 mostra a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima do EB127 contra as quatro cepas de *E. coli*.

**Tabela 15 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) obtidas da ação do EB127 contra quatro cepas de *Escherichia coli* em concentrações de  $1,5 \times 10^2$ ,  $1,5 \times 10^3$  e  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL.**

Cepa bacterina	$1,5 \times 10^2$ UFC/mL	$1,5 \times 10^3$ UFC/mL	$1,5 \times 10^4$ UFC/mL
ATCC25922	CIM=CBM =300 mg/mL	CIM=CBM =300 mg/mL	CIM=CBM =300 mg/mL
31/1A	CIM=CBM =200 mg/mL	CIM=CBM =200 mg/mL	CIM=CBM =500 mg/mL
35A	CIM=CBM =300 mg/mL	CIM=CBM =300 mg/mL	CIM=CBM >1000 mg/mL
51A	CIM=CBM =500 mg/mL	CIM=CBM >1000 mg/mL	CIM=CBM >1000 mg/mL

Legenda: CIM=concentração inibitória mínima, CBM=concentração bactericida mínima.

Fonte: a autora; SUFFREDINI, 2016.

#### 5.1.4.2 Resultados da análise citotóxica

As mesmas frações foram testadas quanto a sua citotoxicidade contra as células tumorais de mama e próstata. Os resultados demonstraram que tais frações não apresentaram atividade antitumoral.

As tabelas 16 e 17 mostram os resultados obtidos das frações de alcaloides totais extraídos de AT2267 frente às amostras de tumores de mama e próstata.

**Tabela 16 - Resultados obtidos da análise da citotoxicidade do extrato bruto EB127, dos alcaloides totais AT2267 e suas frações e dos alcaloides totais AT2268 sobre células tumorais de mama (MCF-7).**

Mama (MCF-7)	%Cresc.	%Inib.Cresc	%Letalidade
<b>Doxorrubicina</b>	-	-	25.71
<b>Dimetilsulfóxido</b>	217.42	0.00	0.00
<b>EB127</b>	78.01	21.99	0.00
<b>AT2267</b>	101.60	0.00	0.00
<b>AT2268</b>	100.75	0.00	0.00
<b>100%AT2267</b>	98.11	1.89	0.00
<b>50% AT2267</b>	100.86	0.00	0.00
<b>25% AT2267</b>	85.27	14.73	0.00
<b>15% AT2267</b>	90.54	9.46	0.00
<b>11% AT2267</b>	96.22	3.78	0.00
<b>7% AT2267</b>	97.08	2.92	0.00

Legenda: DOXO=doxorrubicina; %Cresc = porcentagem de crescimento = valor correspondente ao quanto de células continuaram viáveis após o tratamento; %Inib.Cresc = porcentagem de inibição de crescimento = quantidade de células inviáveis após o tratamento; esta quantidade foi obtida a partir da subtração da quantidade de células viáveis de 100%, ou seja,  $100 - 82.79 = 17.21$ , por exemplo. % Letalidade = porcentagem de letalidade=quantidade de células inviáveis resultantes ao tratamento, considerando-se os valores obtidos para as células viáveis no tempo zero, ou T0, que representa quantas células cresceram nas 24 horas que antecedem a adição do tratamento. Então, o valor de letalidade significa que o tratamento foi letal às células durante o tempo de ensaio mais às células que cresceram nas primeiras 24 h anteriores ao início do tratamento.

Fonte: a autora; SUFFREDINI, 2016.

**Tabela 17 - Resultados obtidos da análise da citotoxicidade do extrato bruto EB127, dos alcaloides totais AT2267 e suas frações e dos alcaloides totais AT2268 sobre células tumorais de próstata (PC-3).**

Próstata (PC-3)	%Cresc.	%Inib.Cresc	%Letalidade
<b>Doxorrubicina</b>	-	-	16.27
<b>Dimetilsulfóxido</b>	199.38	0.00	0.00
<b>EB127</b>	78.09	21.91	0.00
<b>AT2267</b>	88.09	11.91	0.00
<b>AT2268</b>	92.33	7.67	0.00
<b>100%AT2267</b>	94.70	5.30	0.00
<b>50% AT2267</b>	100.81	0.00	0.00
<b>25% AT2267</b>	96.07	3.93	0.00
<b>15% AT2267</b>	95.70	4.30	0.00
<b>11% AT2267</b>	105.55	0.00	0.00
<b>7% AT2267</b>	100.31	0.00	0.00

Legenda: DOXO=doxorrubicina; %Cresc = porcentagem de crescimento = valor correspondente ao quanto de células continuaram viáveis após o tratamento; %Inib.Cresc = porcentagem de inibição de crescimento = quantidade de células inviáveis após o tratamento; esta quantidade foi obtida a partir da subtração da quantidade de células viáveis de 100%, ou seja,  $100 - 82.79 = 17.21$ , por exemplo. % Letalidade = porcentagem de letalidade=quantidade de células inviáveis resultantes ao tratamento, considerando-se os valores obtidos para as células viáveis no tempo zero, ou T0, que representa quantas células cresceram nas 24 horas que antecedem a adição do tratamento. Então, o valor de letalidade significa que o tratamento foi letal às células durante o tempo de ensaio mais às células que cresceram nas primeiras 24 h anteriores ao início do tratamento.

82.79=17.21, por exemplo. % Letalidade = porcentagem de letalidade=quantidade de células inviáveis resultantes ao tratamento, considerando-se os valores obtidos para as células viáveis no tempo zero, ou T0, que representa quantas células cresceram nas 24 horas que antecedem a adição do tratamento. Então, o valor de letalidade significa que o tratamento foi letal às células durante o tempo de ensaio mais às células que cresceram nas primeiras 24 h anteriores ao início do tratamento.

Fonte: a autora; SUFFREDINI, 2016.

## 5.2 *Buchenavia oxycarpa*

### 5.2.1 Resultados botânicos

A tabela 18 relaciona os dados botânicos e de coleta referentes às espécies que originaram os extratos ativos, apresentados em trabalhos anteriores.

**Tabela 18 – Dados botânicos e de coleta dos frutos de *Buchenavia oxycarpa* cujo extrato foi ativo contra *Escherichia coli* foi selecionado em trabalhos prévios.**

Coletor	AAO
Número da coleta	3379
Data da coleta	02-04-1999
Família	Combretaceae
Espécie	<i>Buchenavia oxycarpa</i> (Mart.) Eichler
Número do extrato	EB725
Parte da planta	Fruto
Rendimento	13,46%
Localização	2°59'Lat / 60°26'Long

Legenda: AAO=sigla referente ao coletor.

Fonte: CAMMARGO; SUFFREDINI, 2014.

### 5.2.2 Resultados da análise química

### 5.2.2.1 Resultados da análise química das frações de EB725

O extrato EB725 foi fracionado de acordo com o mesmo procedimento adotado para o EB127, que está representado no material e método figura 2, e reproduzido na tabela 19 com as respectivas massas do extrato bruto, fases de partição e suas frações geradas.

**Tabela 19 - Avaliação dos pesos das frações e das fases de partição geradas do fracionamento do extrato bruto de *Buchenavia oxycarpa*.**

<b>Extrato bruto</b>	<b>10,6024g</b>
<b>Fração de partição CHCl<sub>3</sub></b>	<b>4,0406g</b>
Fração Hex/CHCl <sub>3</sub>	2,6075g
Fração DCM/CHCl <sub>3</sub>	0,1638g
Fração MeOH/CHCl <sub>3</sub>	1,2693g
<b>Fração de partição BuOH</b>	<b>3,4303g</b>
Fração 10%ACN/BuOH	2,3202g
Fração 50%ACN/BuOH	0,7688g
Fração MeOH/BuOH	0,3413g
<b>Fração de partição H<sub>2</sub>O</b>	<b>3,1315g</b>
Fração 10%ACN/H <sub>2</sub> O	2,5575g
Fração 50%ACN/H <sub>2</sub> O	0,4391g
Fração MeOH/H <sub>2</sub> O	0,1349g

Legenda: DCM=diclorometano; MeOH=metanol; BuOH=butanol; ACN=aceto nitrila.

Fonte: CAMARGO; SUFDREDINI, 2014.

Foram obtidos os perfis cromatográficos por meio do CLAE da fração MeOH/CHCl<sub>3</sub>, das frações 10%ACN/BuOH, 50%ACN/BuOH e 100%MeOH/BuOH e das frações 10% ACN/H<sub>2</sub>O, 50%ACN/H<sub>2</sub>O e 100%MeOH/H<sub>2</sub>O, sendo possível avaliar a presença ou ausência de compostos majoritários e obter o perfil cromatográfico.

A partir dos fracionamentos, novas cromatografias em camada delgada analítica e preparativa foram realizadas a fim de isolar compostos, e por meio dessas etapas, foram isoladas cinco amostras originadas apenas da fração Hex/CHCl<sub>3</sub>, e encaminhadas para RMN, denominadas de UNIP317, UNIP318, UNIP319, UNIP320 e UNIP321, ainda em análise.

### 5.2.2.2 Alcaloides totais obtidos pelo meio ácido a partir do EB725

EB725 foi submetido à extração de alcaloides totais a partir do EB, sendo possível visualizar os rendimentos na tabela 20.

**Tabela 20 - Rendimentos gerados da extração de alcaloides totais a partir do extrato bruto de *Buchenavia oxycarpa* método ácido.**

Extrato bruto	15000 mg
Torta obtida da extração dos alcaloides totais a partir do EB725	Pesagem não realizada, pois a amostra ainda não havia secado
Hexano 1 fase de partição da extração de alcaloides totais do EB725	25,8 mg
Hexano 2 fase de partição da extração de alcaloides totais do EB725	8,6 mg
Alcaloides totais do EB725	81,9 mg

Fonte: a autora; SUFFREDINI, 2016.

Após a realização da extração dos alcaloides totais a partir do extrato bruto, um miligrama de alcaloides totais foi diluído em metanol, filtrado e analisado por CLAE analítico (figura 16 do anexo 1).

### 5.2.3 Resultados da análise biológica

#### 5.2.3.1 Resultados da análise antimicrobiana

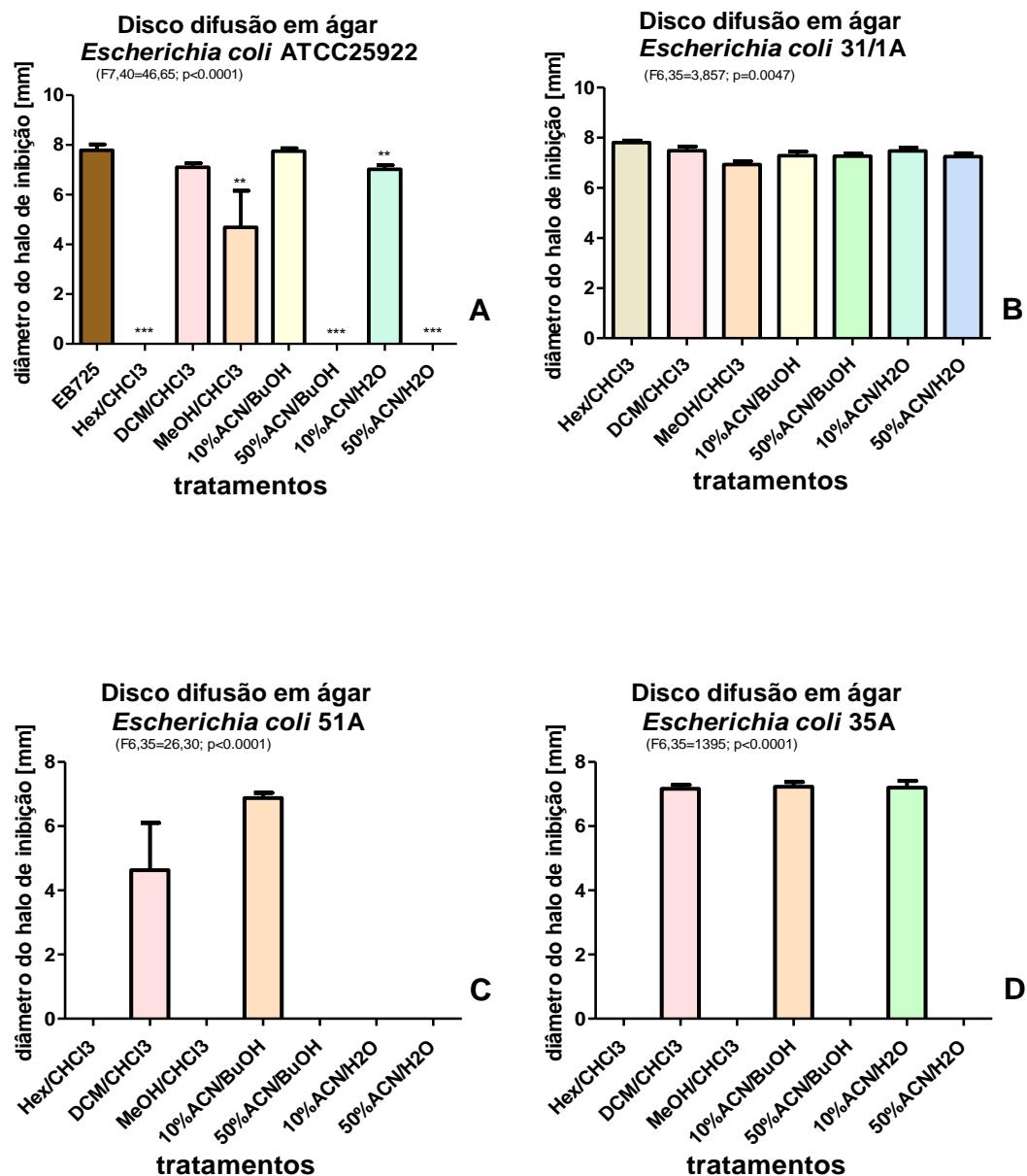
##### 5.2.3.1.1 Resultados da análise antimicrobiana por meio da disco difusão em agar

EB725 apresentou atividade antibacteriana contra a cepa referência de *E. coli*, ATCC25922, assim como as frações DCM/CHCl<sub>3</sub> = 10%/H<sub>2</sub>O > 10/ BuOH > MeOH/CHCl<sub>3</sub>, em ordem do mais ativo para o menos ativo em relação ao EB725 ( $F_{7,40}=46,65$ ;  $p<0.0001$ ). Em relação à cepa 31/1A (virulenta e resistente), todas as frações apresentaram diferentes graus de atividade antibacteriana, embora baixa ( $F_{6,35}=3,857$ ;  $p=0.0047$ ). A cepa de *E.coli* 51A (virulenta e não resistente) foi sensível à ação das frações DCM/CHCl<sub>3</sub> e 10%ACN/BuOH ( $F_{6,35}=26,30$ ;  $p<0.0001$ ). Os resultados relativos à atividade antibacteriana das frações contra a bactéria *E. coli* 35A demonstraram que as frações DCM/CHCl<sub>3</sub>, 10%ACN/BuOH e 10%ACN/H<sub>2</sub>O foram

ativos, enquanto as outras frações não demonstraram atividade ( $F_{6,35}=1395$ ;  $p<0.0001$ ).

Após o fracionamento, as frações geradas foram testadas por meio da técnica de DDA contra as quatro cepas de *E. coli* (figura 71).

Figura 71 - Avaliação a da ação antimicrobiana do extrato bruto e suas frações de *Buchenavia oxycarpa* frente a quatro cepas de *Escherichia coli*, pelo ensaio da disco difusão em ágar.



Fonte: a autora; SUFFREDINI, 2016.

### 5.2.3.1.2 Resultados da análise antimicrobiana por meio da microdiluição em caldo

Posteriormente, realizaram-se ensaios em microdiluição em caldo para determinar as concentrações inibitórias mínimas e concentrações bactericidas mínimas contra as quatro cepas de *E. coli* (tabela 21).

**Tabela 21 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) obtidas da ação do extrato bruto de *Buchenavia oxycarpa* contra quatro cepas de *Escherichia coli* em concentrações de  $1,5 \times 10^2$ ,  $1,5 \times 10^3$  e  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL.**

Cepa bacterina	$1,5 \times 10^2$ UFC/mL	$1,5 \times 10^3$ UFC/mL	$1,5 \times 10^4$ UFC/mL
ATCC 25922	CIM=CBM=200 mg/mL	CIM=CBM=200 mg/mL	CIM=CBM=500 mg/mL
31/1A	CIM=CBM=400 mg/mL	CIM=CBM=500 mg/mL	CIM=CBM=700 mg/mL
35A	CIM=CBM=200 mg/mL	CIM=CBM=300 mg/mL	CIM=CBM=400 mg/mL
51A	CIM=CBM=300 mg/mL	CIM=CBM=500 mg/mL	CIM=CBM=600 mg/mL

Fonte: a autora; SUFFREDINI, 2016.

### 5.2.3.2 Resultados da análise citotóxica

O extrato bruto 725 foi submetido a testes de citotoxicidade contra tumores de mama e próstata de humanos (tabela 22).

**Tabela 22 - Resultados obtidos da análise da citotoxicidade do extrato bruto de *Buchenavia oxycarpa* sobre células tumorais de mama (MCF-7) e de próstata (PC-3)**

Mama (MCF-7)	%Cresc.	%Inib.Cresc	%Letalidade
Doxorrubicina	-	-	25.71
Dimetilsulfóxido	217.42	0.00	0.00
EB725	91.06	8.94	0.00
Próstata (PC-3)	%Cresc.	%Inib.Cresc	%Letalidade
Doxorrubicina	-	-	16.27
Dimetilsulfóxido	199.38	0.00	0.00
EB725	86.14	13.86	0.00

Legenda: DOXO=doxorrubicina; %Cresc = porcentagem de crescimento = valor correspondente ao quanto de células continuaram viáveis após o tratamento; %Inib.Cresc = porcentagem de inibição de crescimento = quantidade de células inviáveis após o tratamento; esta quantidade foi obtida a partir da subtração da quantidade de células viáveis de 100%, ou seja,  $100 - 82.79 = 17.21$ , por exemplo. % Letalidade = porcentagem de letalidade=quantidade de células inviáveis resultantes ao tratamento, considerando-se os valores obtidos para as células viáveis no

tempo zero, ou T0, que representa quantas células cresceram nas 24 horas que antecedem a adição do tratamento. Então, o valor de letalidade significa que o tratamento foi letal às células durante o tempo de ensaio mais às células que cresceram nas primeiras 24 h anteriores ao início do tratamento.

Fonte: a autora; SUFFREDINI, 2016.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 *Microplumeria anomala*

Embora desprovida de utilização popular ou econômica, *M. anomala* foi coletada dentro do Projeto Rio Negro, que visa à prospecção em larga escala de espécies amazônicas e da Mata Atlântica. Embora recentemente as coletas sejam randômicas, no início do projeto havia uma preferência por coletar espécies pertencentes a determinados grupos taxonômicos, dentre os quais espécies de Apocynaceae. Esse grupo de plantas é conhecido por apresentar uma rica quantidade de metabólitos secundários, muitos dos quais protagonistas na terapêutica, como os alcaloides da vinca (MOUDI; GO; YIEN et al., 2013), glicosídeos cardioativos que ocorrem em diversas espécies, como no chapéu-de-napoleão, ou *Thevetia peruviana* (TIAN; CHENG; JIANG et al., 2016), iridoides (YE; YANG; XIA et al., 2008) e compostos fenólicos (OKONKWO TJ, OSADEBE PO, PROKSCH, 2016; OUNAISSIA; PERTUIT; MITAINE-OFFER et al., 2016; WONG; LIM; ABDULLAH et al., 2011; LIANG ; YUE; LI, 2010).

EB127 foi obtido do caule de *Microplumeria anomala*, pertencente à família Apocynaceae. Não há relatos na literatura que demonstrem estudos referentes à atividade antibacteriana com a espécie a não ser o do próprio grupo (CAMARGO; SUFFREDINI, 2014), bem como não foram encontrados dados na literatura sobre espécies do gênero *Microplumeria* que sejam relevantes para o trabalho. Gêneros correlatos como *Aspidosperma* apresentam um número maior de estudos. Desses, o extrato metanólico bruto da casca de *A. ramiflorum* e suas frações foram avaliadas contra *Staphylococcus aureus* e contra *Bacillus subtilis*, sendo que os compostos ramifloria A e B apresentaram atividade antibacteriana significativa contra ambas as bactérias (TANAKA; SILVA; OLIVEIRA et al., 2006).

Há poucos relatos referentes a essa espécie, porém já foi detectada a presença de alcaloides aspidocarpina, anomalina 12-O-metilanomalina e dimetoxianomalina (PINTO; FERREIRA, 2012; CORDELL, 1998; REIS LUZ; ROCHA; PORTER et al., 1983).

Frente à necessidade de se identificar os compostos ativos, as frações HEX e DCM da fase de partição  $\text{CHCl}_3$  foram selecionadas para serem estudadas quimicamente, visto que eram as de maior massa e as que puderam ser submetidas às técnicas cromatográficas disponíveis.

O extrato EB127 foi selecionado para o presente estudo a partir da identificação de sua atividade antibacteriana contra a cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922. Os extratos foram subsequentemente testados contra as cepas de *E. coli* isoladas de cloaca de aves. Na figura 68, é possível avaliar a atividade do EB127 contra as quatro cepas de *E. coli*, no modelo da DDA. Ao comparar a efetividade da atividade antibacteriana do EB127 sobre a cepa de referência, ATCC 25922, EB127 apresentou atividade estatisticamente semelhante ( $\alpha>0,05$ ) àquela observada contra as cepas 31/1A (virulenta e resistente) e 51A (virulenta e não resistente), ao passo que a atividade observada contra a cepa 35A (não virulenta e resistente) foi menor ( $\alpha<0,05$ ).

A tabela 3 mostra o ensaio da MDC realizada com EB 127 contra as quatro cepas de *E. coli*, preparadas em diferentes concentrações. A cepa 31/1A (virulenta e resistente) apresentou-se mais suscetível à ação de EB127, ao passo que a cepa 51A (virulenta e não resistente) apresentou-se mais resistente à ação do extrato. Em ambos os modelos, a cepa 35A (não virulenta e resistente) apresentou-se mais resistente, e a cepa ATCC, mais suscetível.

Como a avaliação foi realizada com o extrato bruto, algumas situações podem ter acontecido: (1) a atividade antibacteriana do extrato bruto se deve a compostos que estava em grande quantidade e uma vez isolada, a atividade antibacteriana pode aumentar; (2) a atividade antibacteriana do extrato bruto se deve a compostos presentes em baixa quantidade, porém são potentes suficientes para produzirem a atividade observada; (3) a atividade antibacteriana se dá por conta de um sinergismo observado entre as diferentes moléculas que compõem o extrato bruto (ELLER; FEITOSA; ARRUDA et al., 2015). A identificação de compostos ativos passou a ser primordial para a elucidação do potencial antimicrobiano de EB127.

EB 127 foi fracionado e nove frações de diferentes polaridades foram obtidas. Essas frações foram submetidas ao ensaio de DDA, conforme se verifica na figura 69. Das nove frações obtidas, algumas não foram testadas no modelo biológico por não

terem massa suficiente e, portanto, não constam nos resultados. Pode-se observar que a única fração que apresentou atividade contra a cepa ATCC 25922 foi a 10%ACN/H<sub>2</sub>O. Essa mesma fração apresentou fraca atividade contra a cepa 31/1A (virulenta e resistente), uma atividade significante contra a cepa 35A (sem virulência e resistente) e nenhuma atividade contra a cepa 51A (virulenta, sem resistência). A fração apolar Hex/CHCl<sub>3</sub> não apresentou atividade contra a cepa de referência ATCC 25922, nem contra a cepa 35A (sem virulência e resistente), mas se apresentou ativa tanto contra a cepa 31/1A (virulenta e resistente) quanto contra a cepa 51A (virulenta e sem resistência). Tais resultados podem estar ligados diretamente às diferenças entre as características relativas à presença de resistência e de virulência de cada cepa, ou seja, como os diferentes compostos presentes em cada uma destas duas frações poderiam influenciar os mecanismos de ação antimicrobianos envolvidos. Estes estudos ainda devem ser realizados. Segundo os dados encontrados neste estudo, a fração Hex/CHCl<sub>3</sub> foi ativa em ambas as cepas que possuem virulência, ao passo que a fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O apresentou atividade contra as duas cepas que apresentaram resistência.

O fracionamento realizado com EB127 foi acompanhado da submissão das frações oriundas e compostos isolados aos ensaios biológicos. Das frações oriundas das fases de partição Hex e DCM, foram isolados os compostos lupeol, 3-acetil-11-oxo-β-amirina e 3-acetil-11-oxo-α-amirina, sitosterol e estigmasterol, 3β,7α-dihidroxi-colest-5-eno, 3β-hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3β-hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona, ácido vanílico glicosilado, ácido protocatecuico glicosilado, ácido rosmarínico, loganino, ácido logânico, ácido cafeoil-met-O-quínico, ácido metil-dicafeoilquínico, secologanino, ácido dihidrobenzoico hexosídeo, Iridoide com peso molecular 376 (sugere-se isômeros ácido 8-*epi*-logânico ou ácido logânico), iridoide com peso molecular 390 (sugere-se isômeros 8-*epi*-loganino ou 7-*epi*-loganino ou loganino), iridoide com peso molecular 404 (sugere-se isômeros secologanosídeo-7-metil éster e secologanino) e ácido 4-O-feruloilquínico, além dos alcaloides anomalina e 12-O-metilanomalina.

Compostos fenólicos podem ser encontrados em diversas plantas, e podem apresentar a função de proteger o vegetal de predadores, inibição da germinação de sementes, inibir o crescimento de outras plantas de espécies diferentes, apresentam efeitos antioxidantes, antibacteriano, antiviral, indução da apoptose celular e

interferência do ciclo celular. A ação antioxidante dos compostos fenólicos deve-se a sua estrutura molecular e suas propriedades redutoras, as quais são capazes de neutralizar ou capturar os radicais livres (FREITAS, 2012; SANTOS, 2008 e SANTOS, 2013).

O lupeol é um triterpenoide pertencente à classe dos terpenos que são considerados metabólitos secundários de origem vegetal (SALEEM, 2009). O lupeol pode ser encontrado em algumas plantas de uso medicinal e em frutas como uvas, morangos, manga, figo e azeitonas (SALEEM, 2009). Estudos recentes mostram que o lupeol vem sendo estudado e possui ação antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral principalmente contra tumores de cabeça, pescoço e melanomas (NITTA; AZUMA; HATA et al., 2013).

O lupeol foi testado no modelo da DDA contra a *E. coli* cepa ATCC 25922 e não apresentou atividade antimicrobiana ou citotóxica significativas, nos modelos empregados no presente trabalho. A literatura oferece dados controversos relativos à atividade antibacteriana de lupeol. Enquanto alguns autores relatam a atividade deste composto contra bactérias Gram positivas e fungos (SAYED; EZZAT; SABRY, 2016; POUMALE; AWOSSONG; RANDRIANASOLO; SIMO et al., 2012), outros relatam que a atividade antibacteriana de triterpenos isolados, incluindo lupeol, expressas como concentração inibitória mínima maior que 1 mg/mL (WANSI; CHIOZEM; TCHO et al., 2010). Ainda, a presença de lupeol em frações ativas contra micro-organismos também está presente na literatura (OBEY; VON WRIGHT; ORJALA et al., 2016), assim como a presença do lupeol em frações ativas não foi evidenciada como sendo fundamental para a atividade antibacteriana encontrada (WANG; CHEN; WU et al., 2016), que ressaltaram os ácidos oleanoico e ursólico como os principais componentes.

Estudos realizados com *Aspidosperma pyrifolium* originadas da região da Caatinga, apresentavam em sua composição a presença de alcaloides, de lupeol e de amirina, porém não há estudos que comprovem que tais moléculas isoladas estejam relacionadas às atividades biológicas mencionadas (OLIVEIRA; SALTINO, 2000). A planta chinesa *Ilex asprella* é comumente utilizada na fabricação de medicamentos anticancerígenos, antigripais e anti-inflamatórios. A espécie tem como principais componentes os triterpenos α- e β-amirina (ZHENG; XU; MA et al., 2014). Segundo

estudos de Otuki, Ferreira, Lima et al. (2005), α- e β-amirina, associados tem o potencial de promover analgesia. Os compostos β-amirina e β-sitosterol foram encontrados nas espécies *Prosopis glandulosa* e *Symplocos racemosa*, da Índia, que vêm sendo estudadas por possuírem atividade imunomoduladora (FIRASHATHULLA; INAMDAR; RAFIQ et al., 2016).

Alcaloides são compostos presentes em alguns grupos de plantas. Seu uso como venenos e medicamentos é conhecido desde os tempos primórdios por diversas culturas e civilizações. Os alcaloides podem ser produzidos em diferentes regiões do organismo vegetal, como tecidos de crescimento ativos, células epidérmicas, vasos lactíferos e bainhas vasculares e geralmente são deslocados e armazenados em outras áreas como cascas, folhas e até raízes (SIMÕES; SCHENKEL; GOSMANN et al., 1999).

Há diversas hipóteses relativas à função dos alcaloides nas plantas (SIMÕES; SCHENKEL; GOSMANN et al., 1999), como:

- Proteção da planta contra o ataque de animais ou insetos, já que a maioria dos alcaloides são tóxicos e possuem sabor amargo;
- Compostos de detoxificação de outras substâncias nocivas produzidas pelo metabolismo primário da planta;
- Reserva de nitrogênio;
- Atuação como hormônios de crescimento;
- Auxiliar na manutenção do equilíbrio iônico;
- Defesa contra micro-organismos e vírus;
- Proteção contra a irradiação de UV.

Durante o fracionamento, EB127 e suas frações foram avaliadas à presença de alcaloides e foi verificado que se encontravam dispersos entre frações de diferentes polaridades (figura 60). Foram encontrados dois alcaloides, anomalina e 12-O-metilanomalina, sendo que anomalina foi considerado o composto majoritário presente no extrato bruto obtido do caule da espécie. Após o isolamento dos alcaloides, os que continham massa foram avaliados quanto à sua ação antimicrobiana contra *E. coli*. No ensaio em DDA pode observar que os alcaloides extraídos de *Microplumeria* não foram ativos contra nenhuma cepa de *E. coli* testada

no presente trabalho. Não foram encontrados dados relativos à atividade biológica de ambos os alcaloides, na literatura consultada.

Os alcaloides totais extraídos da espécie vegetal e suas frações foram testados no ensaio de citotoxicidade, e também não foram ativos. Alcaloides de diversas espécies de Apocynaceae são conhecidos por suas atividades farmacológicas, como os alcaloides da vinca (*Catharanthus roseus*) vincristina, vimblastina e outros derivados, que possuem atividade antitumoral por agirem na tubilina (DALL'ACQUA, 2014), ou reserpina, obtida de *Rauwolfia serpentina* (LEÃO; SARMENTO-SILVA; SANTOS et al., 2015).

Sugere-se que as moléculas a seguir estejam presentes na fração 10%ACN/H<sub>2</sub>O: ácido logânico, ácido 8-*epi*-loganino, secologanosida-7-metil éster e secologanino são derivados de iridoides. Os iridoides pertencem à classe dos terpenos e podem ser encontrados em mais de 50 famílias de plantas. Atualmente tem-se catalogado em torno de 2500 iridoides diferentes, originados de plantas e animais. Os iridoides são compostos presentes em diversas angiospermas, tem a função de afastar predadores herbívoros por meio da produção de venenos e apresentarem sabor amargo. À medida que um predador ingere a planta, ocorre a liberação de iridoides que, ao se ligarem a glicosídeos, desencadeiam uma reação no estômago do animal capaz de degradar proteínas do bolo alimentar e até destruição do seu valor nutricional. Suas propriedades biológicas estão relacionadas a atividades anti-inflamatórias, vasoconstritora, hepatoprotetora, antiviral, antitumoral e antibacteriana (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011; SANTOS; OLIVEIRA; CARVALHO, 2016 e TUNDIS; LOIZZO; MENICHINI et al., 2008).

A DDA é uma técnica convenientemente rápida e prática para se avaliar a atividade antimicrobiana, porém a microdiluição em caldo (MDC) é considerada uma técnica mais sensível, obtendo-se a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) (OSTROSKY; MIZUMOTO; LIMA et al., 2008). Nos testes executados com EB127 e EB725 os resultados foram avaliados através da visualização da turbidez seguido da verificação de crescimento de subcultura. Desse modo, não foi possível determinar a diferença entre a CIM e a CBM, que serão consideradas iguais. No presente estudo, foram realizados ambos os experimentos com as amostras, e assim, considerados complementares.

Do fracionamento biodirecionado realizado com EB127, 49 amostras purificadas foram testadas no modelo da DDA contra a cepa ATCC 25922 e observou-se que as amostras cujas moléculas foram identificadas não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano ou de proporcionar citotoxicidade, porém cinco dessas amostras purificadas e não identificadas apresentaram uma forte tendência a ação antimicrobiana, formando halos de diâmetros grandes compatíveis aos halos da clorexidina (figura 70). Essas amostras serão futuramente encaminhadas para análise em CLAE-EM/EM.

## 6.2 *Buchenavia oxyacarpa*

EB 725, obtido dos frutos de *Buchenavia oxyacarpa*, pertencente à família das Combretaceae, apresentou ação antimicrobiana contra *E. coli* ATCC 25922 em um ensaio de DDA realizado em triplicata (tabela 8).

Por meio da MDC, foram determinadas as CIM e CBM para o EB725 (tabela 9). Em uma breve análise comparativa (tabela 3), observa-se que seus efeitos antibacterianos são mais eficazes que os efeitos observados para EB127, ou seja, a *Buchenavia* demonstrou maior atividade em menor concentração de extrato contra a cepa ATCC.

O EB725 foi fracionado, inicialmente, seguindo a mesma técnica usada para o EB127 (figura 2), que é de execução padronizada para todos os extratos orgânicos da Extratoteca. As nove frações geradas foram testadas em DDA contra as quatro cepas de *E. coli* (figura 71), e pode-se observar que um número maior de frações foram mais ativas contra as cepas, quando comparado ao número de frações ativas provenientes do EB127.

Em termos de eficácia, observa-se que um número maior de frações obtidas de EB725 apresentou atividade contra a cepa de referência, ATCC 25922, enquanto que todas as frações testadas apresentaram um grau de atividade contra a cepa 31/1A (virulenta e resistente), como foi observado para as frações do EB127. Três frações de EB725 (DCM/CHCl<sub>3</sub>, 10%ACN/BuOH e 10%ACN/H<sub>2</sub>O) apresentaram atividade contra a cepa 35A (sem virulência e resistente), contra apenas uma fração de EB127

e duas frações (DCM/CHCl<sub>3</sub> e 10%ACN/BuOH) de EB725 apresentaram atividade contra a cepa 51A (virulenta, sem resistência) contra apenas uma fração (Hex/CHCl<sub>3</sub>) de EB127. Embora a complexidade química de *M. anomala* aparenta ser maior, parece que os compostos presentes em *B. oxycarpa* podem ser mais eficazes como antibacterianos. Estudos referentes aos componentes de *B. oxycarpa* precisam ser realizados. No decorrer dos experimentos, pode ser observado que *Buchenavia oxycarpa* demonstrou ser uma espécie menos complexa, em termos de compostos secundários, quando comprada a *Microplumeria anomala*, baseado nos perfis de fracionamento e ensaios biológicos realizados.

Estudos prévios realizados com espécies de *Buchenavia* demonstraram a capacidade antifúngica de extratos obtidos de *B. tomentosa* contra espécies de *Candida* (TEODORO; BRIGHENTI; DELBEM et al., 2015) contra vários micro-organismos de importância em Odontologia (BRIGHENTI; SALVADOR; DELBEM et al., 2014) enquanto que frações obtidas das folhas de *B. tetraphylla* apresentaram atividade contra diversos micro-organismos Gram positivos e negativos, além da presença de flavonoides triterpenos, carboidratos e taninos (DE OLIVEIRA; NASCIMENTO DA SILVA; DA SILVA et al., 2012), porém não foi identificada a presença de alcaloides, embora estes sejam reportados em espécies de Combretaceae (UZOR; OZADEBE, 2016; FANKAM; KUIATE; KUETE et al., 2015; MOYO; CHIMPONDA; MUKANGANYAMA, 2014). Nesse estudo, apesar de não ter identificado até o momento compostos, já sabe-se que foi encontrado a presença de alcaloides na *Buchenavia oxycarpa*. Na literatura já havia relatos descritos sobre a existência dos alcaloides nestas plantas (CORDELL, 1998; TEODORO, 2011).

## 7 CONCLUSÃO

- As frações Hex e DCM da fase de partição  $\text{CHCl}_3$  e a fração de 10%ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  originadas do EB127 de *Microplumeria anomala* apresentaram atividade antimicrobiana assim como as frações DCM/ $\text{CHCl}_3$ , 10%ACN/ $\text{BuOH}$  e 10%ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  originadas do EB725 de *Buchenavia oxycarpa*;
- A partir de *Microplumeria anomala* foi possível identificar as moléculas de lupeol, sitosterol, estigmasterol, 3-acetil-11-oxo- $\beta$ -amirina, 3-acetil-11-oxo- $\alpha$ -amirina, 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-colest-5-eno, 3 $\beta$ -hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3 $\beta$ -hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona.;
- A fração que apresentou maior atividade antimicrobiana mais eficaz contra a cepa 35A contém possivelmente a presença de ácido dihidrobenzoico hexosideo, ácido rosmarínico, isômeros 8-*epi*-logânico ou 7-*epi*-loganino ou laganino, derivado de ácido ferúlico, isômeros de secologanosido-7-metil éster, isômeros secologanino e ácido 4-O-feruloilquínico;
- Na avaliação de citotoxicidade dos extratos brutos e da fração de alcaloides totais em células cancerígenas de mama e próstata observou-se que nenhuma amostra apresentou atividade.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAN, N. H.; SALIM, F.; AHMAD, R. Chemical constituents of Malaysian *U. cordata* var *ferruginea* and their *in vitro*  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities. **Molecules**, v. 21, p.525-535, 2016.
- AZEVEDO, C. M. A., Bioprospecção: Coleta de material biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos. **Reserva da Biodiversidade da Mata Atlântica-MAB-UNESCO**. 2<sup>a</sup>ed. São Paulo, cad. 17, p. 35, 2003. Disponível em: <<http://www.semarh.pb.gov.br/comites/rbma/pdf/cad17.pdf>>. Acesso em: 25/02/2010.
- BARBIERI, N. Resistência a antibióticos, prevalência dos fatores associados à virulência, tipagem filogenética e perfil filogenéticos de isolados de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC). 2010, 113f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de biotecnologia – Programa de pós-graduação em biologia celular e molecular, 2010. Disponível em:<<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/30211/000778158.pdf?sequence=1>>. Acesso em; 10 ago. 2016.
- BARBOSA, A. P.; NASCIMENTO, C. S.; MORAIS, J. W. Estudos de propriedades antitermíticas de extratos brutos de madeira e casca de espécies florestais da Amazônia Central, Brasil. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 37, n. 2, p.213-218, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aa/v37n2/v37n2a06>>. Acesso: 15/06/2015.
- BARNES, R. A.; PEREIRA, A. L.; SCOFIELD, T. C. V., et al. A new triterpene from *Vellozia compacta*. **Chemical pharmaceutical bulletin**, v. 32, n. 9, p. 3674-3677, 1984.
- BORATTO, A. J.; LOPES, D. C.; OLIVEIRA, R. F. M. et al. Uso de antibiótico, de probiótico e de homeopatia em frangos de corte criados em ambiente de conforto, inoculados ou não com *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p.1477-1485, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S151635982004000600014&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151635982004000600014&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 29 jan. 2014. DOI: 10.1590/S1516-35982004000600014.
- BRASIL. Decreto nº 2519, de 16 de março de 1998. Disponível em: <<http://br.vlex.com/vid/mar-diversidade-biologica-assinada-34323209#ixzz0irci2w0f>>. Acesso em: 25/02/2010.

BRIGHENTI, F. L.; SALVADOR, M. J.; DELBEM, A. C. et al. Systematic screening of plant extracts from the Brazilian Pantanal with antimicrobial activity against bacteria with cariogenic relevance. **Caries Research.**, v. 48, n. 5, p.353-360, 2014.

CALIXTO, J. B., Biodiversidade como Fonte de Medicamentos. **Ciência e Cultura-Biodiversidade/Artigos**. São Paulo, v.55, n. 3, p.9, 2003. Disponível em: <[http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S000967252003000300022](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000967252003000300022)>. Acesso em: 01/03/2010.

CAMARGO, L. R. P., SUFFREDINI, I. B. Atividade anti-*Escherichia coli* de extratos de plantas brasileiras. Novas tendências em pesquisa veterinária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Minas Gerais, v. 66, n. 2, p. 617, 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010209352014000200041&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010209352014000200041&script=sci_arttext)>. Acesso em 15/05/2014.

CAMARGO; L. R. P.; SUFFREDINI, I. B. Impacto causado por *Escherichia coli* na produção de animais de corte no Brasil: revisão de literatura. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 33, n. 2, p.193-197, 2015. Disponível em:<[https://www.unip.br/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2015/02\\_abr-jun/V33\\_n2\\_2015\\_p193a197.pdf](https://www.unip.br/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2015/02_abr-jun/V33_n2_2015_p193a197.pdf)>. Acesso em 03/05/2016.

CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson** . Trad. BARROS, C. S. L. 2<sup>ª</sup>ed. Porto Alegre: Artmed, 1998.

CARVALHO, R. A.; LACERDA, J. T.; OLIVEIRA L. F. et al. Extratos de plantas medicinais como estratégia para o controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea sp*) no Nordeste. **Rechearch Gate**, v.1, p.11, 2000. Disponível em:<<http://www.emepa.org.br/anais/volume1/av107.pdf>>. Acesso em: 17/03/2010.

CARVALHO, V. M.; GYLES, C. L.; ZIEBELL, K. et al., Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical APEC serotype isolate from neotropical nonhuman primates. **Journal Clinic Microbioligy**, v. 41, n. 3., p. 1225-1234, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC150271/>>. Acesso em: 20 jun 2016.

CORDELL, G. A. (ed) 1998. **The Alkaloids**. Academic Press, Ed. California, v. 51, p. 27.

COURA, F. M.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B., Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9,

- p. 811-818, 2014. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/pesqvetbras/article/view/24458/25341>>. Acesso em: 20 jun 2016.
- CRAGG, G. M.; e NEWMAN, D. J. Natural Products as sources of new drugs from 1981 to 2014, **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2014.
- CUBAS, Z. S.; DIAS, J. L. C.; SILVA, J. C. R. **Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca. 2007. p. 1354.
- CUNHA, M. P. V.; ALVES NETO, A. F.; SUFFREDINI, I. B. Avaliação da atividade anti-helmíntica de extratos brutos de plantas da Floresta Amazônica e Mata Atlântica brasileira sobre *Haemonchus contortus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 374-80, 2014. Disponível em:<[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010209352014000200008&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010209352014000200008&script=sci_arttext&tlng=pt)>. Acesso em: 17/03/2016.
- CURSINO, L. M. C.; MESQUITA, A. S. S.; MESQUITA, D.W.O. et al. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). **Acta Amazônica**, v. 39, n. 1, p.181-186, 2009.
- DALL' ACQUA, S. Natural products as antimitotic agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 20, p. 2272-2285, 2014.
- DALÓLIO, F. S.; MOREIRA, J.; VALADARES, L. R., et al., Aditivos alternativos ao uso de antibióticos na alimentação de frangos de corte. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 5, n.1, p. 86-94, 2015. Disponível em: <<http://www.rbas.ufv.br/index.php/rbas/article/view/281/259>>. Acesso: 17/09/2016.
- DI, L.; LI, N.; ZU, L-B. et al. Three new iridoid glucosides from roots of *Patrinia scabra*. **Bulletin Korean Chemical Society**, v. 32, n. 9, p. 3251-3254, 2011.
- DÍAZ, I. E. C. **Estudo fitoquímico de espécies de Araceae de São Paulo**. 2007. Tese(Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. [DOI:10.11606/T.46.2007.tde-14082007-155130](https://repositorio.usp.br/14082007-155130). Acesso em: 2016-11-15.
- DOKLI, I.; NAVARINI, L.; HAMERSAK, Z. Syntheses of 3-,4- and 5-O-feruloylquinic acids. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 24, p. 785-790, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095741661300253X>>. Acesso em: 20 jun 2016.

ELLER, S. C. W. S.; FEITOSA, V. A.; ARRUDA, T. A.; et al. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica *in vitro*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Science**, v. 36, n. 1, p. 131-136, 2015.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING – EUCAST. **Teste sensibilidade aos antimicrobianos.** Método de disco difusão EUCAST, versão 5.0, 2015. Disponível em:< <file:///C:/Users/Livia/Downloads/Manual-Disco-Difusa%CC%83o-BrCAST-03-2016.pdf>>. Acesso em: 20/03/2016.

FANKAM, A. G.; KUIATE, J. R.; KUETE, V. Antibacterial and antibiotic resistance modifying activity of the extracts from *Allanblackia gabonensis*, *Combretum molle* and *Gladiolus quartianianus* against Gram-negative bacteria including multi-drug resistant phenotypes. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 206, 2015. DOI: 10.1186/s12906-015-0726-0.

FERREIRA, A. J. P.; REVOLLEDO, L. **Patologia Aviária**. São Paulo: Manole, 2009, p. 510.

FILHO, J. P. O.; SILVA D. P. G.; PACHECO, M.D., et al. Diarreia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 27, n. 10, p. 17, out. 2007. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v27n10/a06v2710.pdf>>. Acesso em: 01/03/2010.

FINGOLO, C. E.; SANTOS, T. de S.; VIANNA FILHO, M.D.M.; et al. Triterpene esters: natural products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae). **Molecules**, v. 18, p. 4247-4256, 2013.

FIRASHATHULLA, S.; INAMDAR, M. N.; RAFIQ, M.; et al. IM-133N - A useful herbal combination for eradicating disease-triggering pathogens in mice via immunotherapeutic mechanisms. **Journal Pharmacopuncture**, v. 19, n. 1, p. 21-27, 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4887748/>>. Acesso: 03/04/2016.

FREITAS, E. S. S. **Estudo do efeito antimicrobiano de extractos de agrião-de-água (*Nasturtium officinale* R. Br.) e de isotiocianatos em isolados de origem humana e animal.** 2012, 80f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Dourado, 2012. Disponível em:< [http://repositorio.utad.pt/bitstream/10348/2910/1/msc\\_essfreitas.pdf](http://repositorio.utad.pt/bitstream/10348/2910/1/msc_essfreitas.pdf)>. Acesso em: 10 ago. 2016.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S., Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1,

2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010046702011000100005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010046702011000100005&script=sci_arttext)>. Acesso em: 20 jun 2016.

GONÇALVES-MARIETO, G. A.; LIMA, E. T.; SEQUEIRA, J. L.; et al. Colisepticemia em papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) – Relato de Caso. **Revista Brasileira de saúde e Produção Animal**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 56-60, 2007. Disponível em: <<http://www.rbspa.ufba.br/index.php/rbspa/article/viewArticle/735>>. Acesso em: 10/03/2010.

GRECO, D. B. Ética, Saúde e Pobreza: As Doenças Emergentes do Século XXI. **Revista Bioética**, Minas Gerais, v. 7, n. 2, 2009. Disponível em: <<http://www.portalmedico.org.br/revista/bio2v7/etica.htm>>. Acesso em: 02/03/2010.

GUO, A-L; CHEN, L-M.; WANG, Y-M et al. Influence of sulfur fumigation on the chemical constituents and antioxidant activity of buds of *Lonicera japonica*. **Molecules**, v. 19, p. 16640-16655, 2014.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. 1999. **Alcaloides: generalidade e aspectos básicos**. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; et al. Farmacognosia da planta ao medicamento. Editora da UFSC e Editora da Universidade, Florianópolis e Porto Alegre, p.641-656, 1999.

HOLLAND, H. L.; DIAKOW, P. R. P.; TAYLOR, G. J.  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectra of some C-19-hydroxy, C-5,6 epoxy, C-24 ethyl, and C-19-norsteroids. **Canadian Journal of the Chemistry**, v. 56, p. 3121-3127, 1978.

KNOBL, T., GODOY, S. N., MATUSHIMA, E. R., et al. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, suplemento, p. 54-60, 2008. Disponível em: <<http://www.fumvet.com.br/novo/revista/45/suplemento/54-60.pdf>>. Acesso em: 23/02/2010.

KOVGANKO, N. V.; KASHKAN, Z. N.; BORISOV, E. V. et al.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of  $\beta$ -sitosterol derivates with oxidized rings A and B Chemistry of natural compounds. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 35, n. 6, p. 646-649, 1999.

- KUCHARSKA, A. Z.; FECKA, I. Identification of iridoids in edible honeysuckle berries (*Lonecera caerulea* L. var. *kamtschatiaca* Sevast.) by UPLC-ESI-qTOF-MS/MS. **Molecules**, v. 21, p. 1157-1180, 2016.
- LEÃO, A. H.; SARMENTO-SILVA, A. J.; SANTOS, J. R. et al. Molecular, neurochemical, and behavioral hallmarks of reserpine as a model for parkinson's disease: new perspectives to a long-standing model. **Brain Pathology**, v. 25, n. 4, p. 377-390, 2015.
- LEVINE, D. P. Vancomycin: a history. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. S5-12, 2006. Disponível em: <[http://cid.oxfordjournals.org/content/42/Supplement\\_1/S5.full.pdf](http://cid.oxfordjournals.org/content/42/Supplement_1/S5.full.pdf)>. Acesso: 22/09/2016.
- LIANG, T.; YUE, W.; LI, Q. Comparison of the phenolic content and antioxidant activities of *Apocynum venetum* L. (Luo-Bu-Ma) and two of its alternative species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 11, p. 4452-4464, 2010.
- LIAN-WEN, Q.; CHUN-YUN, C. H., PING, L., Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in Flos *Lonicerae japonicae* by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, p. 3227-3242, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19725056>>. Acesso em 22/10/2016.
- LOPES, L. O.; de LACERDA, M. S.; RONDA, J. M. et al. Uso de antibióticos na cura e controle de mastite clínica e subclínica causada por principais microorganismos contagiosos em bovinos leiteiros: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 21, p. 1-15, 2013. Disponível em:< <file:///C:/Users/Livia/Downloads/27922-46327-1-SM.pdf>>. Acesso em: 23/10/2016.
- MACHADO, L. S.; NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, A. L. A. et al., PCR na detecção de gene *Feb A* de *Escherichia coli* em frangos de corte condenados por aerossaculite pela Inspeção Sanitária Federal. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 80, n. 2, 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S180816572013000200002&script=sci\\_arttext&tIngl=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S180816572013000200002&script=sci_arttext&tIngl=pt)>. Acesso em: 20 jun 2016.
- MARINHO, S. R. M. Função dos Alcaloides Indólicos Monoterpenoides de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Departamento de Botânica**. Porto, p. 68, 2001. Disponível em : <<http://74.125.155.132/scholar?q=cache:J1OVRqDCrGYJ:scholar.google.com/+Fun>>.

[%C3%A7%C3%A3o+dos+Alcal%C3%B3ides+Ind%C3%B3icos+Monoterpen%C3%  
B3ides+de&hl=pt-BR&as\\_sdt=2000>](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2853033/). Acesso em: 16/03/2010.

MARKEY, B. K.; CARTE, M. E.; DONNELLY, W. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Trad. WEISS, L. H. N., WEISS, R. D. N. Porto Alegre: Artmed, p. 512, 2005.

*Microplumeria in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.ibrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB33725>>. Acesso em: 11 Nov. 2016

MONKS A.; SCUDIERO D.; SKEHAN P. et al., Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p. 757-766, 1991.

MONTANARI, C. A., BONZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**. São Paulo, v. 24, n. 1, p. 16, jan/fev.2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010040422001000100018&lng=en&nrm=iso&tlang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422001000100018&lng=en&nrm=iso&tlang=pt)>. Acesso em: 17/03/2010.

MOUDI, M.; GO, R.; YIEN, C. Y. et al. Vinca alkaloids. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1231-1235, 2013.

MOYO, R.; CHIMPONDA, T.; MUKANGANYAMA, S. Inhibition of hematopoietic prostaglandin D2 synthase (H-PGDS) by an alkaloid extract from *Combretum molle*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 221, 2014. DOI: 10.1186/1472-6882-14-221. PubMed PMID:24996417; PubMed Central PMCID: PMC4227128.

NETO, L. G., LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. São Paulo, v. 30, n. 2, p. 30, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010040422007000200026&script=sci\\_arttext&tlang=es](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010040422007000200026&script=sci_arttext&tlang=es)>. Acesso em: 04/03/2010.

NITTA, M.; AZUMA, K.; HATA, K. et al., Systemic and local injections of lupeol inhibit tumor growth in a melanoma-bearing mouse model. **Journal Biomedical Reports**, v. 1, p. 641-645, 2013.

- OBEY, J. K.; VON WRIGHT, A.; ORIJALA, J. et al. Antimicrobial activity of *Croton macrostachyus* stem bark extracts against several human pathogenic bacteria. **Journal of Pathogens**, v. 2016, p.1-5, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1453428>
- OKONKWO, T. J.; OSADEBE, P. O.; PROKSCH, P. Bioactive phenylpropanoids, phenolic acid and phytosterol from *Landolphia owariensis* P. Beauv stringy seed pulp. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 1, p. 78-80, 2016.
- OLIVEIRA, A. F. M., SALATINO, A. Major constituents of the foliar epicuticular waxes of species from the Caatinga and Cerrado. **A Journal of Biosciences**, v. 55, p. 9-10, 2000. Disponível em:< <https://www.degruyter.com/view/j/znc.2000.55.issue-9-10/znc-2000-9-1003/znc-2000-9-1003.xml>>. Acesso em 10/09/2016.
- OLIVEIRA, V. B.; FREITAS, M. S. M.; MATHIAS, L. et al. Atividade biológica e alcaloides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 92-99, 2009. Disponível em:< [http://www.sbpmed.org.br/download/issn\\_09\\_1/revisao1\\_v11n1\\_p92-99.pdf](http://www.sbpmed.org.br/download/issn_09_1/revisao1_v11n1_p92-99.pdf)>. Acesso em: 06/10/2016.
- OLIVEIRA, Y. L.; NASCIMENTO da SILVA, L. C.; DA SILVA, A. G. et al. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretoidae). **Scientific World Journal**, v. 2012; 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1100/2012/849302>
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, 2008. Disponível em:< [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2008000200026](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000200026)>. Acesso em: 02/09/2016.
- OTUKI, M. F.; FERREIRA, J.; LIMA, F. V.; et al. Propriedades antinociceptivo da mistura de alfa-amirina e triterpenos beta-amirina: e evidências para a participação da proteína quinase C e vias quinase uma proteína. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 313, n. 1, p. 310, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15626726>>. Acesso: 03/04/2016.
- OUNAISSIA, K.; PERTUIT, D.; MITAINE-OFFER, A. C. et al. New pregnane and phenolic glycosides from *Solenostemma argel*. **Fitoterapia**, v. 114, p. 98-104, 2016.

PAREJO, I.; JÁUREGUI, O.; VILADOMAT, F., et al., Characterization of acylated flavonoid-O-glycosides and methoxylated flavonoids from *Tagetes maxima* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, p. 2801-2810, 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.1697/abstract;jsessionid=A4F0B68EF2310548EB473DF0982AF567.f01t03>>. Acesso em: 20 jun 2016.

PASTORE, A. P. W. **Análise da resistência a antimicrobianos e determinação dos grupos filogenéticos em isolados de *Escherichia coli* de origem ambiental, humano e animal.** 2014, 76f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente ) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014. Disponível em:<<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/131912/000980958.pdf?sequence=1>>. Acesso em; 10 ago. 2016.

PINTO, A. C.; FERREIRA, V. F.; SILVA, F. C. Otto R. Gottlieb e as conexões com o Brasil de Ernest Wenkert . **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2317-2323, 2012.

POUMALE, H. M.; AWOUSSONG, K. P.; RANFRIANASOLO, R. et al. Long-chain alkanoic acid esters of lupeol from *Dorstenia harmsiana* Engl. (Moraceae). **Natural Product Research**, v. 26, n. 8, p. 749-55, 2012.

REIS LUZ, A. L. R.; da ROCHA, A. I.; PORTER, B. et al. Alakaloids from *Microplumeria anomala*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 10, p. 2301-2304, 1983.

REVILLA, J. **Plantas úteis da Bacia Amazônica.** INPA/SEBRAE-AM. Manaus, v. 1, p. 444, 2002.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A. et al. **Flora da Reserva ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central.** Manaus: INPA DFID, p. 459-461, 1999.

RODOSTITS, O. M.; GAY, C.; BLOOD, D. C.; et al. **Clínica Veterinaria: um tratamento de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos.** Trad. WEISS, L. H. N., WEISS, R. D. N. 9<sup>a</sup>.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 700-701, 2005.

SALEEM, M. Lupeol, A novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer Letters**, v. 285, n. 2, p. 109–115, 2009. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2764818/>>. Acesso em: 20/09/2016.

SANTOS, A. B.; RIBEIRO-OLIVEIRAS, J. P.; CARVALHO, C. M. Sobre a botânica, a etnofarmacologia e a química de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, 2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151605722016000500383&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151605722016000500383&script=sci_arttext)>. Acesso em: 20 jun 2016.

SANTOS, A. E. **Avaliação do potencial antioxidante e caracterização química das frações cromatográficas e extrato etanólico das folhas de *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steudel.** 2008, 127f. Monografia (Departamento de Química) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Alto São Francisco, 2008. Disponível em:<<http://br.monografias.com/trabalhos-pdf/avaliacao-potencial-antioxidante-caracterizacao-quimica/avaliacao-potencial-antioxidante-caracterizacao-quimica.pdf>>. Acesso em; 10 ago. 2016.

SANTOS, A. V., FIALHO, E. T., ZANGERÔNIMO, M. G., et al., Aditivos antibióticos, probióticos e prebióticos em rações para leitões desmamados precocemente. **Portal de Revistas Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 1, 2016. Disponível em:<<http://revistas.bvs-vet.org.br/cab/article/view/29089/30773>>. Acesso: 20/09/2016.

SANTOS, U. D. **Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do ácido rosmarínico.** 2013, 110f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2013. Disponível em <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/122777/325556.pdf?sequencia=1&isAllowed=y>>. Acesso em; 10 ago. 2016.

SAYED, A. M.; EZZAT, S. M.; SABRY, O. M. A new antibacterial lupane ester from the seeds of *Acokanthera oppositifolia* Lam. **Natural Product Research**, v. 4, p. 1-6, 2016.

SCHUCH, L. F.; WIEST, J. M.; COIMBRA, H. S. et al. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microrganismos relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**. Goiás, v. 9, n. 1, p. 161-169, 2008. Disponível em:<<http://revistas.ufg.br/index.php/vet/article/viewArticle/968>>. Acesso em: 10/03/2010.

SCHÜTZ, K.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. Ex WIGG.) root and herb by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v, 19, p. 179-186, 2005.

SILVA, J. R. M. **Caracterização molecular de genes isolados de *Escherichia coli* de salpingites e dermatoses em aves ao abate.** 2016, 52f. Dissertação (Mestrado) -

- Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2016. Disponível em:<  
<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/6006/5/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Jayane%20Ricardo%20Monteiro%20da%20Silva%20-%202016.pdf>>. Acesso em; 10 ago. 2016.
- SILVA, J. P. C.; CASTILHO, A. L.; SARACENI, C. H. C. et al. Anti-Streptococcal activity of Brazilian Amazon Rain Forest plant extracts present discloses a potential to preventive strategies against dental caries. **Journal of Applied Oral Sciences**, v. 22, n. 2, p. 91-7, 2014.
- SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009. Disponível em<  
[https://scholar.google.com.br/scholar?q=Rev.+Bras.+Farm.%2C+90%282%29%3A+124-128%2C+2009+&btnG=&hl=pt-BR&as\\_sdt=0%2C5&as\\_vis=1](https://scholar.google.com.br/scholar?q=Rev.+Bras.+Farm.%2C+90%282%29%3A+124-128%2C+2009+&btnG=&hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&as_vis=1)>. Acesso em: 10/09/2015.
- SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: editora Universidade/UFRGS/ editora da UFSC, p. 641, 1999.
- SMITH, W. B. Carbon-13 NMR Spectroscopy of steroids. **Annual reports on NMR Spectroscopy**, v. 8, p. 199-226, 1978.
- SUFFREDINI, I. B., PACIENCIA, M. L. B., NEPOMUCENO, D. C., et al. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts –*Clusiaceae*.– **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 101, n. 3, jan./mai. 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S00740276200600300011](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S00740276200600300011)>. Acesso em: 04/03/2010.
- SUFFREDINI, I. B., SADER, H. S., GONÇALVES, A. G., et al., Screening of antibacterial active extracts obtained from plants native to Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 379-384, 2004.
- SUFFREDINI, I. B.; BACCHI, E. M.; SAKUDA, T. M. K.; et al. Atividade antibacteriana de extratos de Apocynaceae e CIM de extrato orgânico de caule de *Tabernaemontana*

- angulata*—Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, v. 38, n. 1, 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151693322002000100009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151693322002000100009&script=sci_arttext)>. Acesso em: 05/03/2010.
- SUFFREDINI, I. B.; PACIENCIA, M. L. B.; VARELLA, A. D., et al., *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against a human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. **Fitoterapia**. v. 78, n. 3, p. 223-6, 2007b.
- SUFFREDINI, I. B.; PACIENCIA, M. L. B.; VARELLA, A. D., et al., *In vitro* prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts. **Pharmazie**. v. 61, n. 8, p. 722-24, 2006.
- TANAKA, J. C.; SILVA, C. C.; OLIVEIRA, A. J. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 3, p. 387-91, 2006.
- TEODORO, G. R. 2011. **Avaliação da atividade antifúngica dos extratos de *Buchenavia tomentosa* sobre *Candida* spp.** Dissertação de Mestrado em Biologia Bucal - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 90f. Disponível em: <[http://base.repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/95045/teodoro\\_gr\\_me\\_sjc.pdf?sequence=1](http://base.repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/95045/teodoro_gr_me_sjc.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 15/06/2015.
- TEODORO, G. R.; BRIGHTENTI, F. L.; DELBEM, A. C. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. **Future Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 917-27, 2015. DOI:10.2217/fmb.15.20.
- TIAN, D. M.; CHENG, H. Y.; JIANG, M. M. et al. Cardiac glycosides from the seeds of *Thevetia peruviana*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 1, p. 38-50, 2016.
- TOMAZETTO, G.; SILVA, A. C. M.; VIDOTTO, M. C. Fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* septicêmicas virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. **Biosaudé**, v. 6, n. 1/2, p. 3-16, 2004. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/biosaudé/article/view/27015/19469>>. Acesso em: 20 jun 2016.
- TRABULSI, L. R., CAMPOS, L. C. **Microbiologia**. Colaboradores: CASTRO, A. F.P., TORRES, B. B., CORRÊA, B., et al. São Paulo: Atheneu, 3º ed., p. 215, 2002.
- TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F., et al., Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 4,

2008. Disponível em:<[https://www.researchgate.net/profile/Rosa\\_Tundis/publication/5377539\\_Biological\\_and\\_pharmacological\\_activities\\_of\\_iridoids\\_recent\\_developments/links/0c960537df2a910f58000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Rosa_Tundis/publication/5377539_Biological_and_pharmacological_activities_of_iridoids_recent_developments/links/0c960537df2a910f58000000.pdf)>. Acesso em: 20 jun 2016.
- UZOR, P. F.; OSADEBE, P. O. Antidiabetic activity of the chemical constituents of *Combretum dolichopetalum* root in mice. **EXCLI Journal**, v. 15, p. 290-296, 2016.
- VAZ, R. V. 57f, 2014. **Potencial patogênico de *Escherichia coli* multirresistente aantibióticos isolados de carcaças de frango aprovadas para o consumo humano no Estado de Pernambuco, Brasil**. Dissertação (Curso de pós graduação em Ciência Animal Tropical)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2014. Disponível em:<<http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede/bitstream/tede2/4641/2/Renata%20Valenca%20Vaz.pdf>>. Acesso em: 10/09/2016.
- VON SYDOW, A. C. M. D. G; COOGAN, J. A.; MORENO, A. M.; et al., Ocorrência de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães errantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 4, p. 401-407, 2006. Disponível em:<[http://200.144.6.109/docs/arg/v73\\_4/sydow.pdf](http://200.144.6.109/docs/arg/v73_4/sydow.pdf)>. Acesso em: 20 jun 2016.
- WANG, C. M.; CHEN, H. T.; WU, Z. Y. et al. Antibacterial and synergistic activity of pentacyclic triterpenoids isolated from *Alstonia scholaris*. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 139, 2016.
- WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? ANVISA, Uso racional de medicamentos: temas selecionados, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004. Disponível em:<[http://www.anvisa.gov.br/servicosaudere/2007/2\\_060807/opas\\_1\\_uso\\_indiscriminado.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaudere/2007/2_060807/opas_1_uso_indiscriminado.pdf)>. Acesso em 22/09/2016.
- WANSI, J. D.; CHIOZEM, D. D.; TCHO, A. T. et al. Antimicrobial and antioxidant effects of phenolic constituents from *Klainedoxa gabonensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 10, p. 1124-1129, 2010.
- WONG, S. K.; LIM, Y. Y.; ABDULLAH, N. R. et al. Assessment of antiproliferative and antiplasmodial activities of five selected Apocynaceae species. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 14, n. 11, p. 3, 2011.
- YE, G.; YANG, Y. L.; XIA, G. X. et al. Complete NMR spectral assignments of two new iridoid diastereoisomers from the flowers of *Plumeria rubra* L. cf. *acutifolia*. **Magnetic Resonance Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 1195-7, 2008.

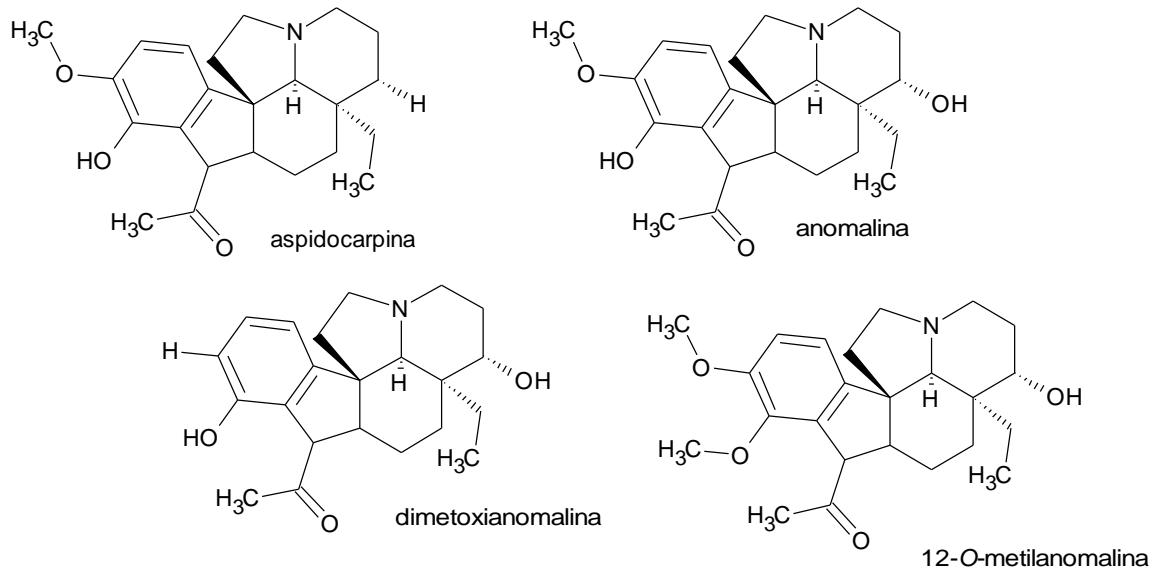
YOUNES, R. N., VARELLA, A. D., SUFFREDINI, I. B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extract using high throughput screening. **CLINICS**, São Paulo, v. 62, n. 6, p. 763-8, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S180759322007000600017&script=sci\\_arttext&tInq=en](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S180759322007000600017&script=sci_arttext&tInq=en)>. Acesso em: 20/02/2010.

ZHENG, X.; XU, H.; MA, X. et al. Triterpenoid saponin biosynthetic pathway profiling and candidate gene mining of the *Ilex asprella* root using RNA-seq. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 54, n. 4, p. 5970-5987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4013608/>>. Acesso: 03/04/2016.

## ANEXO 1

Figuras correspondentes às análises espectroscópicas realizadas na identificação das moléculas.

Figura 1: Estrutura molecular dos alcaloides indólicos: anomalina, 12-O-metilanomalina e dimetoxilanomalina, identificados em *Microplumeria anomala*.

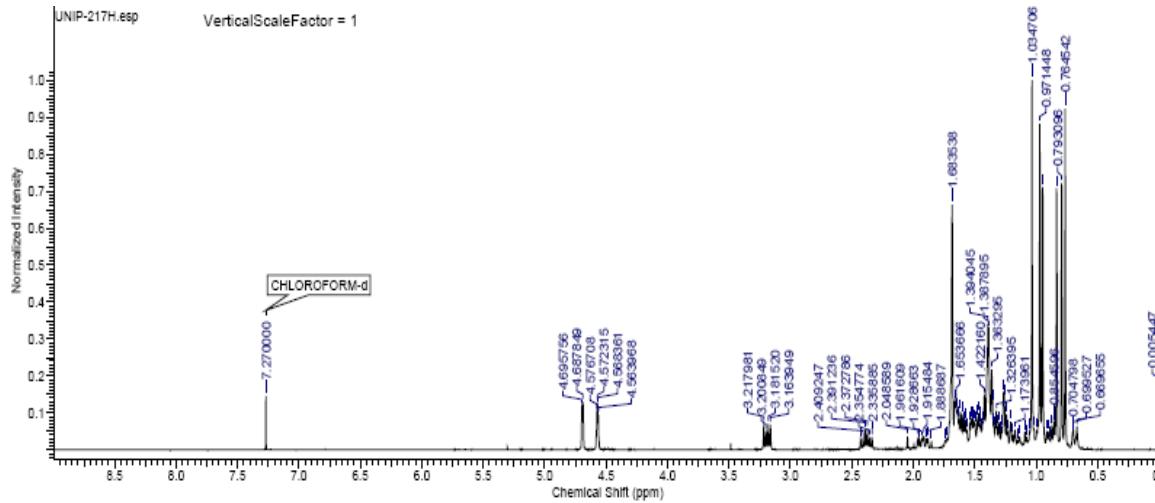


Fonte: REIS LUZ; ROCHA; PORTER et al., 1983

## lupeol

A figura 2 mostra o espectro de RMN-<sup>1</sup>H da amostra de lupeol (UNIP 217) isolada das frações de hexano e diclorometano da fase de partição clorofórmio EB127.

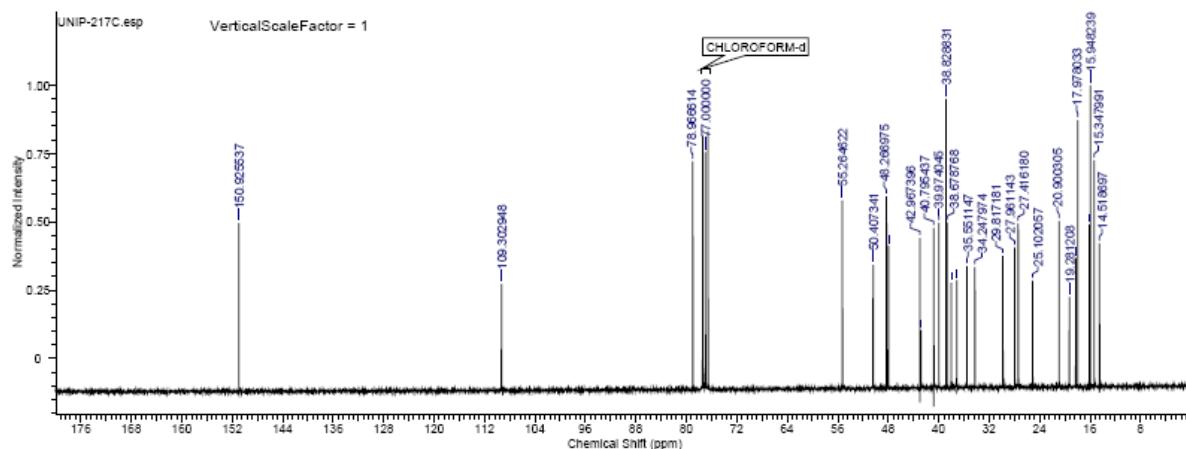
Figura 2 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da amostra de lupeol (UNIP 217), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 3 mostra o espectro de RMN-<sup>13</sup>C da amostra de lupeol (UNIP-217) isolada das frações de hexano e diclorometano da fase de partição clorofórmio EB127.

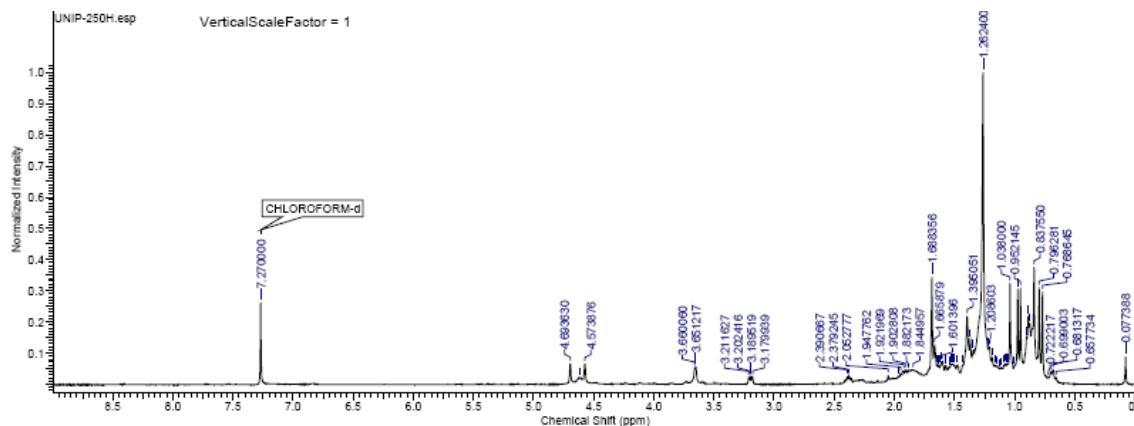
Figura 3 - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) da amostra de lupeol (UNIP-217), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 4 mostra o espectro de RMN-<sup>1</sup>H da amostra de lupeol (UNIP-250) isolada das frações de hexano e diclorometano da fase de partição clorofórmio EB127.

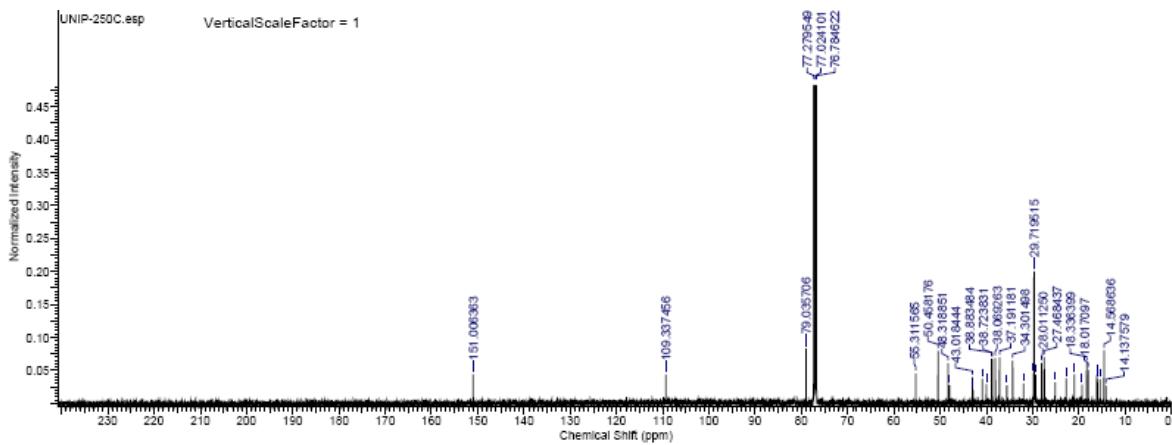
Figura 4 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) da amostra de lupeol (UNIP-250), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 5 mostra o espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) da amostra de lupeol (UNIP-250) isolada das frações de hexano e diclorometano da fase de partição clorofórmio EB127.

Figura 5 - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) da amostra de lupeol (UNIP-250), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*.

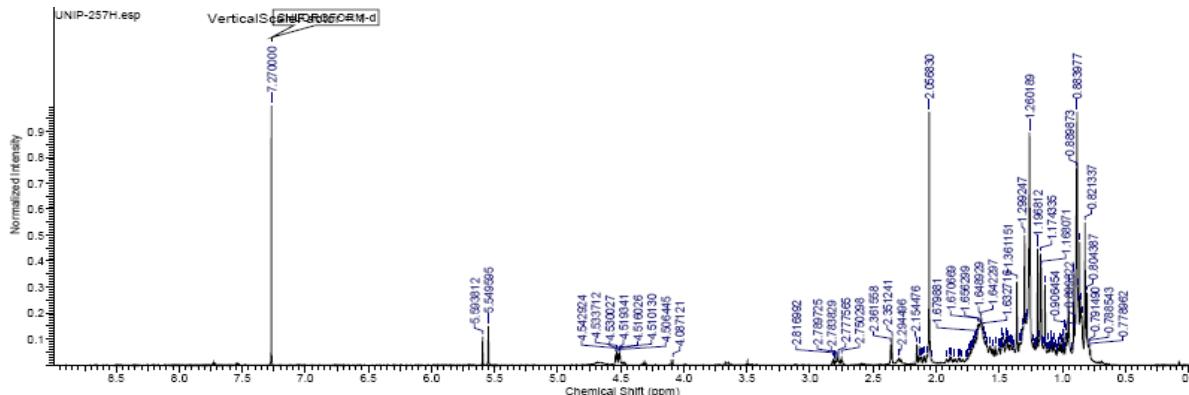


Fonte: DÍAZ, 2016.

**3-acetil-11-oxo- $\beta$ -amirina e 3-acetil-11-oxo- $\alpha$ -amirina.**

A Figura 6 mostra o espectro de RMN-<sup>1</sup>H das amostras de de 3-acetil-11-oxo- $\beta$ -amirina e 3-acetil-11-oxo- $\alpha$ -amirina isoladas da fração de hexano da fase de partição clorofórmio EB127.

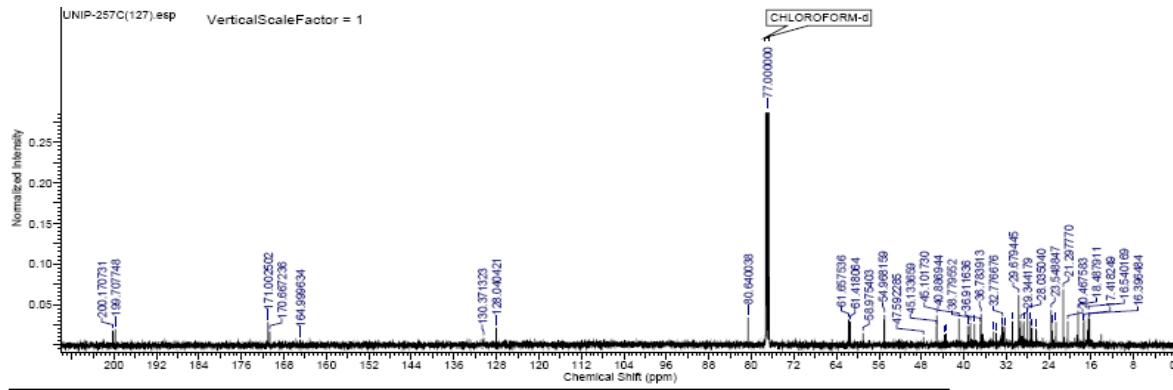
Figura 6 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) da mistura de 3-acetil-11-oxo- $\beta$ -amirina e 3-acetil-11-oxo- $\alpha$ -amirina (UNIP-257), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 7 mostra o espectro de RMN-<sup>13</sup>C das amostras de de 3-acetil-11-oxo- $\beta$ -amirina e 3-acetil-11-oxo- $\alpha$ -amirina isoladas da fração de hexano da fase de partição clorofórmio EB127.

Figura 7- Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) da mistura de 3-acetil-11-oxo- $\beta$ -amirina e 3-acetil-11-oxo- $\alpha$ -amirina (UNIP-257), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*.

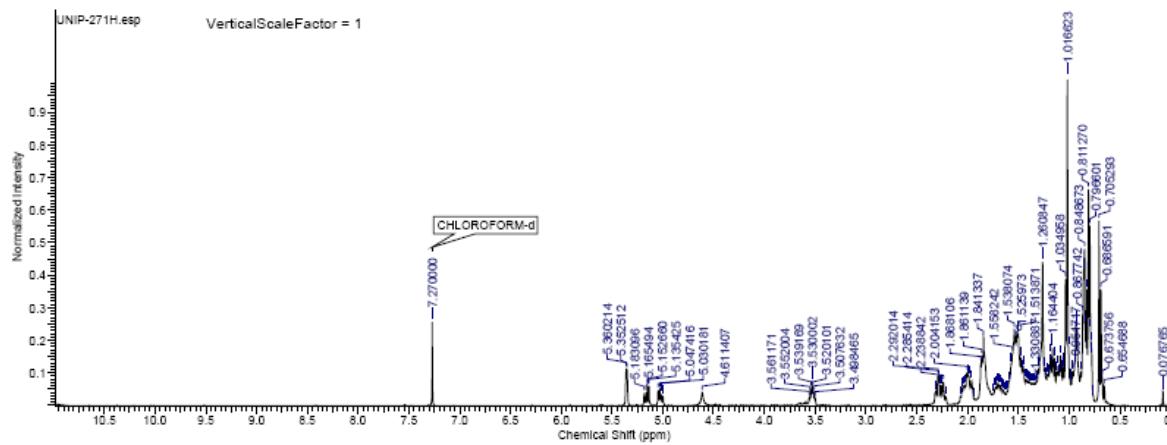


Fonte: DÍAZ, 2016.

## sitosterol e estigmastrol

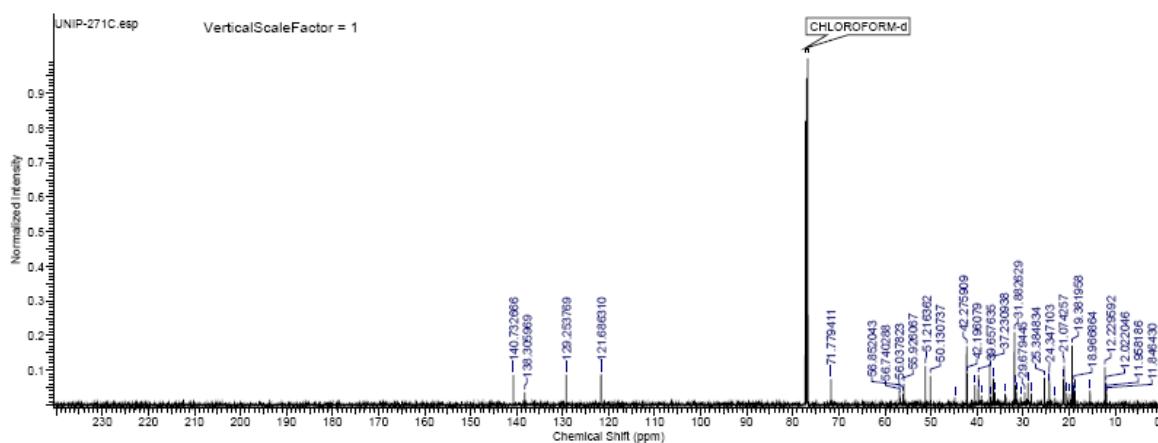
A figura 8 mostra o espectro de RMN-<sup>1</sup>H das amostras de sitosterol e estigmastrol isoladas da fração de hexano da fase de partição clorofórmio EB127.

Figura 8 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) da mistura sitosterol e estigmastrol (UNIP-271), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*.



A figura 9 mostra o espectro de RMN-<sup>13</sup>C das amostras de sitosterol e estigmastrol isoladas da fração de hexano da fase de partição clorofórmio EB127.

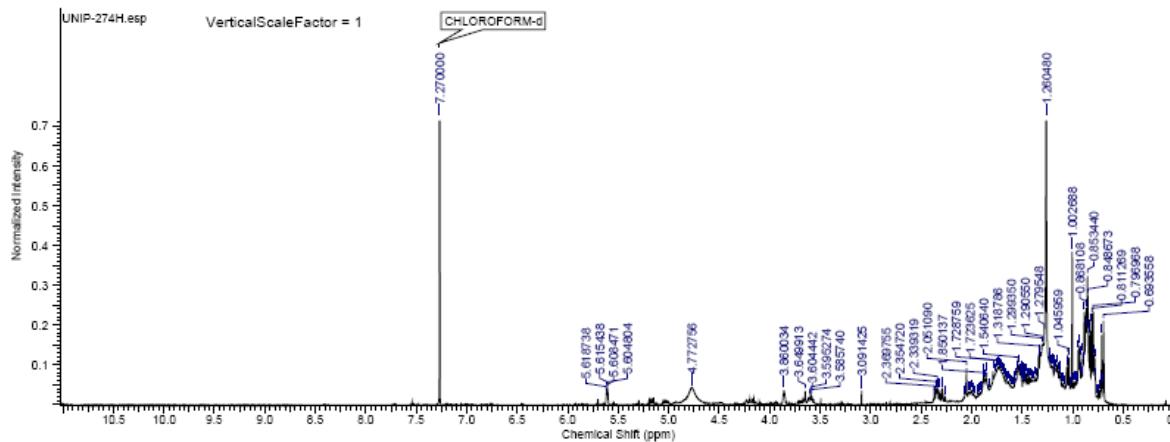
Figura 9- Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) da mistura de sitosterol e estigmastrol (UNIP-271), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*.



## 3β,7α-dihidroxi-colest-5-eno

A figura 10 mostra o espectro de RMN-<sup>1</sup>H da amostra de 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-colest-5-eno isoladas da fração de hexano da fase de partição clorofórmio EB127.

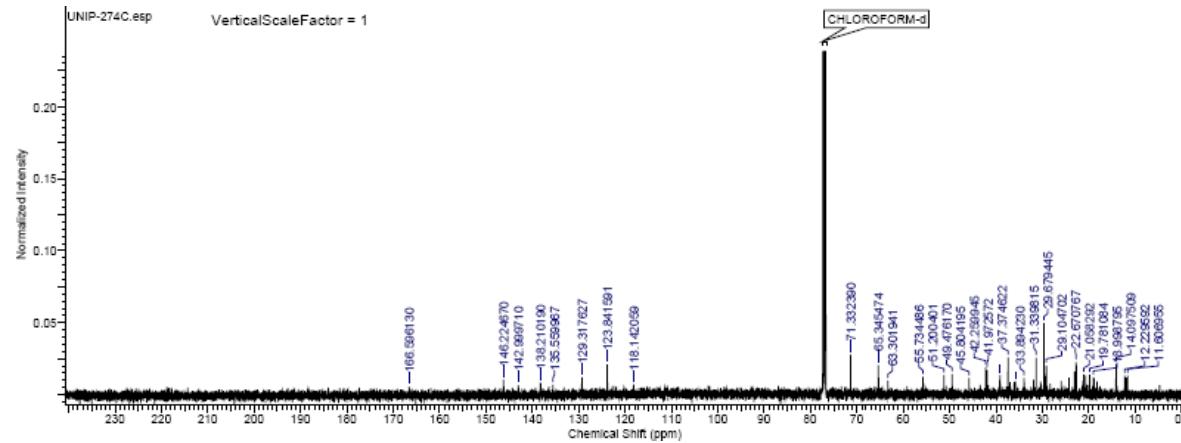
Figura 10- Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-colest-5-eno (UNIP-274), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 11 mostra o espectro de RMN-<sup>13</sup>C da amostra de 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-colest-5-eno isoladas da fração de hexano da fase de partição clorofórmio EB127.

Figura 11 - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) de 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-colest-5-eno (UNIP-274), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*.

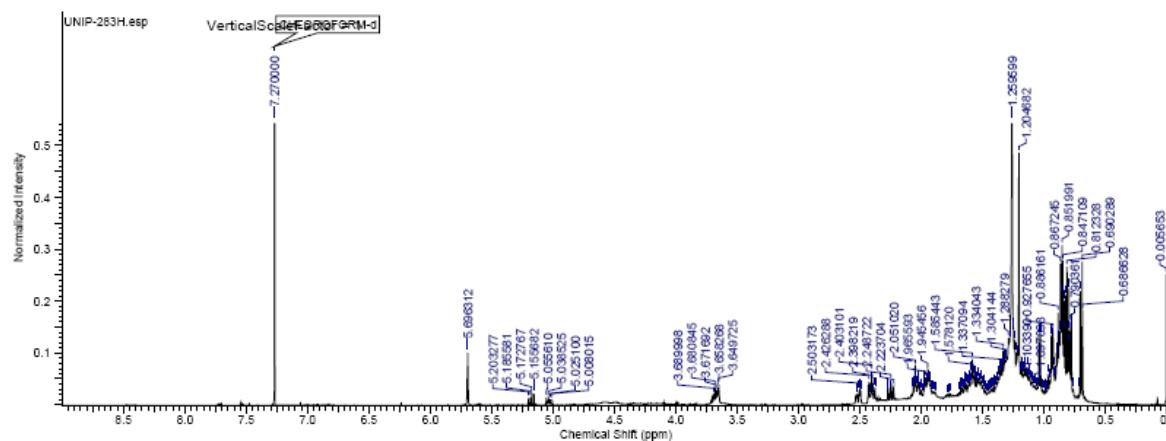


Fonte: DÍAZ, 2016.

**3 $\beta$ -hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3 $\beta$ -hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona**

A figura 12 mostra o espectro de RMN-<sup>1</sup>H da amostra de 3β-hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3β-hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona isoladas das frações de hexano e de diclorometano da fase de participação clorofórmio EB127.

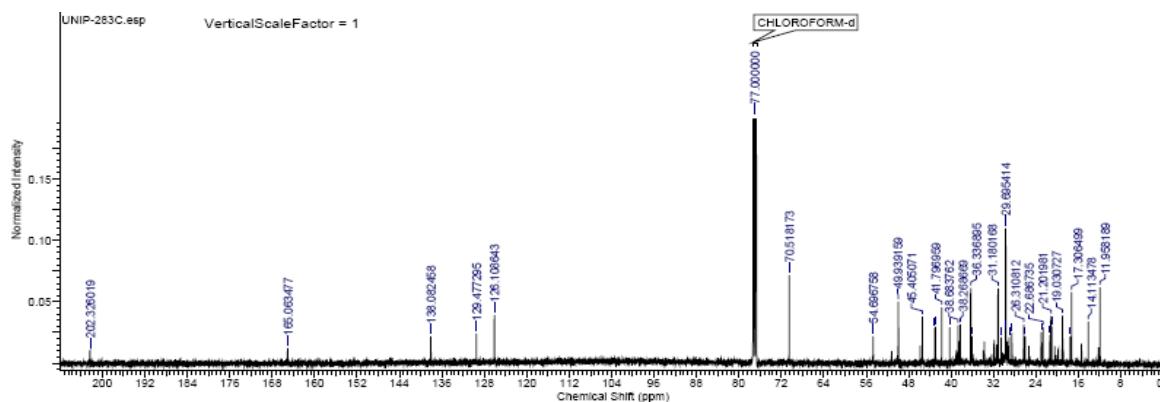
Figura 12- Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) da mistura 3β-hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3β-hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona (UNIP-283), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 13 mostra o espectro de RMN-<sup>13</sup>C da amostra de 3β-hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3β-hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona isoladas das frações de hexano e de diclorometano da fase de participação clorofórmio EB127.

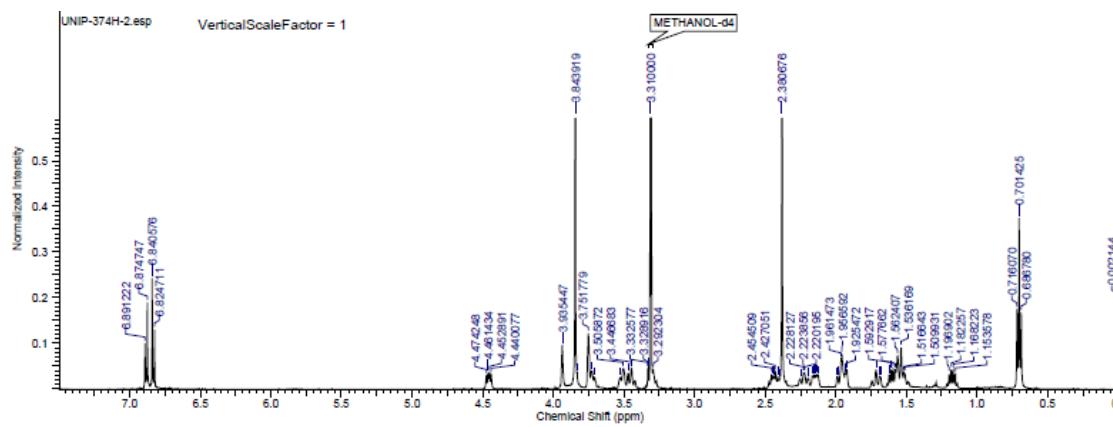
Figura 13 - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) da mistura de 3β-hidroxi-colest-5-en-7-ona e 3β-hidroxi-colest-5,22-dien-7-ona (UNIP-283), originada do EB127 de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 14 mostra o espectro de RMN-<sup>1</sup>H da amostra de anomalina isoladas das frações de hexano e de diclorometano da fase de partição clorofórmio EB127.

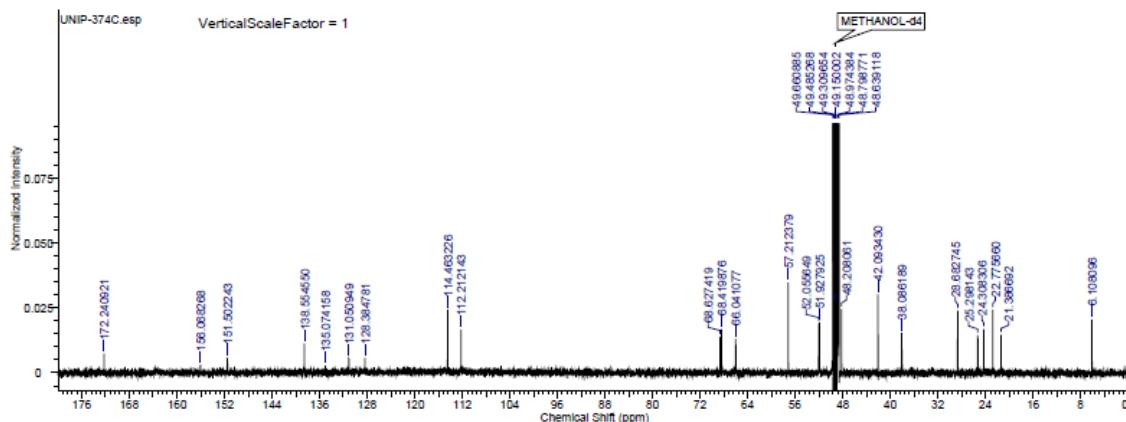
Figura 14 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de anomalina em CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, originada do EB127 de *Microplumeria anomala*.



Fonte: DÍAZ, 2016.

A figura 15 mostra o espectro de RMN-<sup>13</sup>C da amostra de anomalina isoladas das frações de hexano e de diclorometano da fase de partição clorofórmio EB127.

Figura 15 - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de anomalina em CD<sub>3</sub>OC, 125 MHz, originada do EB127 de *Microplumeria anomala*.

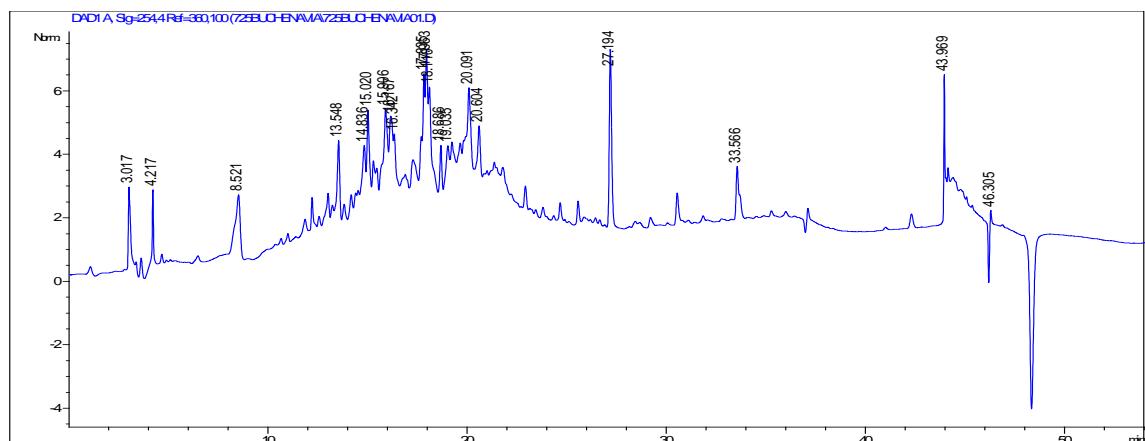


Fonte: DÍAZ, 2016.

### ***Buchenavia oxycarpa***

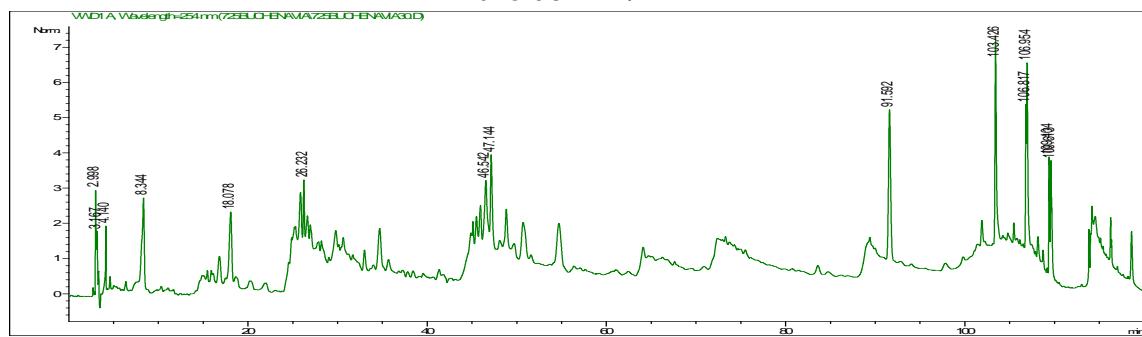
Inicialmente a amostra foi analisada nas seguintes condições cromatográficas:  $T_{0\rightarrow 5\text{min}}$  5% ACN,  $T_{5\rightarrow 35\text{min}}$  100% ACN,  $T_{35\rightarrow 40\text{min}}$  100% ACN,  $T_{40\rightarrow 50\text{min}}$  5% ACN. O cromatograma obtido está apresentado na figura X. Porém a condição cromatográfica ideal foi a seguinte:  $T_{0\rightarrow 10\text{min}}$  5% ACN,  $T_{10\rightarrow 11\text{min}}$  10% ACN,  $T_{11\rightarrow 20\text{min}}$  10% ACN,  $T_{20\rightarrow 21\text{min}}$  20% ACN,  $T_{21\rightarrow 40\text{min}}$  20% ACN,  $T_{40\rightarrow 41\text{min}}$  27% ACN,  $T_{41\rightarrow 60\text{min}}$  27% ACN,  $T_{60\rightarrow 61\text{min}}$  32% ACN,  $T_{61\rightarrow 68\text{min}}$  32% ACN,  $T_{68\rightarrow 69\text{min}}$  39% ACN,  $T_{69\rightarrow 85\text{min}}$  39% ACN,  $T_{85\rightarrow 86\text{min}}$  50% ACN,  $T_{86\rightarrow 96\text{min}}$  50% ACN,  $T_{96\rightarrow 106\text{min}}$  100% ACN,  $T_{106\rightarrow 110\text{min}}$  100% ACN,  $T_{110\rightarrow 120\text{min}}$  5% ACN. O cromatograma obtido desta nova condição cromatográfica está apresentado nas figuras 16 e 17. Definida esta última condição cromatográfica, a amostra será enviada para ser analisada por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC/EM), para determinação de seus componentes.

Figura 16 - Cromatograma dos alcaloides totais do EB 725, de *Buchenavia oxycarpa*, submetido ao gradiente  $T_{0\rightarrow 5\text{min}}$  5% ACN,  $T_{5\rightarrow 35\text{min}}$  100% ACN,  $T_{35\rightarrow 40\text{min}}$  100% ACN,  $T_{40\rightarrow 50\text{min}}$  5% ACN,  $\lambda = 254$  nm, fluxo de 1 mL/min.



Fonte: DÍAZ, 2016.

Figura 17 - Cromatograma dos alcaloides totais do EB725 de *Buchenavia oxycarpa*, submetido ao gradiente  $T_{0 \rightarrow 10\text{min}}$  5% ACN,  $T_{10 \rightarrow 11\text{min}}$  10% ACN,  $T_{11 \rightarrow 20\text{min}}$  10% ACN,  $T_{20 \rightarrow 21\text{min}}$  20% ACN,  $T_{21 \rightarrow 40\text{min}}$  20% ACN,  $T_{40 \rightarrow 41\text{min}}$  27% ACN,  $T_{41 \rightarrow 60\text{min}}$  27% ACN,  $T_{60 \rightarrow 61\text{min}}$  32% ACN,  $T_{61 \rightarrow 68\text{min}}$  32% ACN,  $T_{68 \rightarrow 69\text{min}}$  39% ACN,  $T_{69 \rightarrow 85\text{min}}$  39% ACN,  $T_{85 \rightarrow 86\text{min}}$  50% ACN,  $T_{86 \rightarrow 96\text{min}}$  50% ACN,  $T_{96 \rightarrow 106\text{min}}$  100% ACN,  $T_{106 \rightarrow 110\text{min}}$  100% ACN,  $T_{110 \rightarrow 120\text{min}}$  5% ACN,  $\lambda = 254\text{ nm}$ , fluxo de 1mL/min.



Fonte: DÍAZ, 2016.

## ANEXO 2

Original article

### ***Microplumeria anomala* as source of compounds to be used in veterinary against *Escherichia coli*.**

Camargo, L.R.P.<sup>1</sup>; Carvalho, V.M.; Díaz, I.E.C.<sup>2</sup>; Suffredini, I.B.<sup>1,2</sup>

1 Graduate Program in Environmental and Experimental Pathology, Universidade Paulista, Rua Dr. Bacelar, 1212, Vila Clementino, São Paulo, SP, 04026-002

2 Center for Research in Biodiversity da Universidade Paulista, Av. Paulista, 900, 1º andar, Cerqueira César, São Paulo, SP, 01310-100.

#### **Abstract**

*Escherichia coli* is one of the main pathogen responsible for veterinary and human diseases, which causes important economic losses in livestock, and emotional issues for pet owners. For that reason, new pharmacological tools are a must in the fight against the pathogen. Biodiversity has been one of the main sources of antibiotics, and Brazil is the richest country in terms of terrestrial species richness. The organic extract obtained from the stem of *Microplumeria anomala* (Apocynaceae) was selected out of 1791 plant extracts obtained from more than 600 Amazon species as active against *E. coli* ATCC25922, and against three *E. coli* strains that were isolated from bird's cloaca named 31/1A, 35A and 51A. Lupeol, sitosterol, stigmasterol, 11-oxo-3 $\beta$ -methylamyrin, 11-oxo-3 $\alpha$ -methylamyrin, 3 $\beta$ ,7 $\alpha$  dihidroxy-cholestan-5-en, 3 $\beta$ -ol-choleste-5-en-7-one and 3 $\beta$ -ol-choleste-5,19-dien-7-one, and dihydrobenzoic hexoside acid; rosmarinic acid; isomers 8-epi-loganin acid or loganin acid; 8-epi-loganin or loganin; ferulic acid derivative; isomers secologanoside-7-methyl ester and secoxiloganin; isomer of feruloilquinic acid were identified in the most active fraction named 10%ACNresH<sub>2</sub>O, that was obtained from the organic extract. All the compounds were isolated from the plant for the first time and represents potential new antibacterial natural products isolated from Amazon plants to be used in veterinary.

Keywords: *Escherichia coli*, *Microplumeria anomala*, antibacterial, natural products

#### **References**

- Azevedo, C. M. A., 2003. Bioprospecção: Coleta de material biológico com a finalidade de expor os recursos genéticos. Reserva da Biodiversidade da Mata Atlântica-MAB-UNESCO, 2<sup>ª</sup>ed. São Paulo.
- Barnes, R. A. Pereira, A. L., Scofield, T. C. V., Filho, R. B., Pinto, A. C., 1984. A new triterpene from *Vellozia compacta*. Chem. Pharm. Bull. 32, 3674-3677.

- Camargo, L. R. P., Suffredini, I. B., 2014. Atividade anti-*Escherichia coli* de extratos de plantas brasileiras. Novas tendências em pesquisa veterinária. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 66, 617-620.
- Camargo; L. R. P.; Suffredini, I. B., 2015.** Impacto causado por *Escherichia coli* na produção de animais de corte no Brasil: revisão de literatura. *J. Health Sci. Inst.*, 33, 193-197.
- Carvalho, V. M., Gyles, C. L., Ziebell, K., Ribeiro, M. A., Dias-Catão, J. L., Siinhorini, I. L., Otman, J., Keller, R., Trabulsi, L. R., Castro, A. F. P., 2003. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical APEC serotype isolate from neotropical nonhuman primates. *J. Clin. Micr.*, 41, 1225-1234.
- Cordell, G. A. (ed) 1998. The Alkaloids. Academic Press, Ed. California.
- Cragg, G. M.; e Newman, D. J., 2014. Natural Products as sources of new drugs from 1981 to 2014, *J. Nat. Prod.*, 79, 629-661.
- Cursino, L. M. C., Mesquita, A. S. S., Mesquita, D.W.O., Fernandes, C. C., Junior, O. L. P., Amaral, I. L., Nunez, C. V., 2009. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). *Acta Amaz.*, 39, 181-186.
- Dall' Acqua, S., 2014. Natural products as antimitotic agents. *Cur. Top. Med. Chem.*, 14, 2272-2285.
- Eller, S. C. W. S.; Feitosa, V. A.; Arruda, T. A., Antunes, R. M. P., Catão, R. M. R., 2015. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica in vitro. *Apl. J. Basic Appl. Pharm. Sci.*, 36, 131-136.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST., 2015. Teste sensibilidade aos antimicrobianos. Método de disco difusão EUCAST, versão 5.0.
- Fingolo, C. E., Santos, T. de S., Vianna Filho, M.D.M., Kaplan, M. A. C., 2013. Triterpene esters: natural products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae). *Molecules*, 18, 4247-4256.
- Firashathulla, S., Inamdar, M. N., Rafiq, M., Viswanatha, G. L., Kumar, L. M. S., Babu, U. V., Ramahrishnan, S., Paramesh, R., 2016. IM-133N - A useful herbal combination for eradicating disease-triggering pathogens in mice via immunotherapeutic mechanisms. *J. Pharmacopuncture*, 19, 21-27.
- Greco, D. B., 2009. Ética, Saúde e Pobreza: As Doenças Emergentes do Século XXI. *Rev. Bio.*, 7, 450-455.
- Holland, H. L.; Diakow, P. R. P.; Taylor, G. J.  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectra of some C-19-hydroxy, C-5,6 epoxy, C-24 ethyl, and C-19-norsteroids. *Can. J. Chem.*, 56, 3121-3127, 1978.
- Kovganko, N. V., Kashkan, Z. N., Borisov, E. V., Batura, E. V., 1999.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of  $\beta$ -sitosterol derivates with oxidized rings A and B Chemistry of natural compounds. *Chem. Nat. Compd.*, 35, 646-649.
- Leão, A. H., Sarmento-Silva, A. J., Santos, J. R., Ribeiro, A. M., Silva, R. H., 2015. Molecular, neurochemical, and behavioral hallmarks of reserpine as a model for parkinson's disease: new perspectives to a long-standing model. *Brain Pathol.*, 25, 377-390.
- Machado, L. S., Nascimento, E. R., Perreira, A. L. A., Almeida, D. O., Abreu, D. L. C. Gouvea, R., 2013. PCR na detecção de gene *Fel A* de *Escherichia coli* em frangos de corte condenados por aerossaculite pela Inspeção Sanitária Federal. *Arq. Inst. Biol.*, 80.
- Markey, B. K., Carte, M. E., Donnelly, W. J., Leonard, F. C., 2005.. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Trad. WEISS, L. H. N., WEISS, R. D. N. Porto Alegre: Artmed.
- Moudi, M., Go, R., Yien, C.Y., Nazre, M., 2013. Vinca alkaloids. *Int. J. Prev. Med.*, 4, 1231-1235.

- Nitta, M., Azuma, K., Hata, K., Takahashi, S., Ogiwara, K., Tsuka, T., Imagawa, T., Yokoe, I., Osaki, T., Minami, S., Okamoto, Y., 2013. Systemic and local injections of lupeol inhibit tumor growth in a melanoma-bearing mouse model. *Biomedical Reports*, 1, 641-645.
- Obey, J. K., Von Wright, A., Orijala, J., Kauhanen, J., Tikkanen-Kaukanen, C., 2016. Antimicrobial activity of *Croton macrostachyus* stem bark extracts against several human pathogenic bacteria. *J. Path.*, 2016, 1-5.
- Okonkwo, T. J., Osadebe, P. O., Proksch, P., 2016. Bioactive phenylpropanoids, phenolic acid and phytosterol from *Landolphia owariensis* P. Beauv stringy seed pulp. *Phytother. Res.*, 30, 78-80.
- Oliveira, A. F. M., Salatino, A., 2000. Major constituents of the foliar epicuticular waxes of species from the Caatinga and Cerrado. *J. Biosc.*, 55, 9-10.
- Ounaissa, K., Pertuit, D., Mitaine-Offer, A. C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Delemasure, S., Dutartre, P., Smati, D., Lacaille-Dubois, M., 2016. New pregnane and phenolic glycosides from *Solenostemma argel*. *Fitoterapia*, 114, 98-104.
- Pinto, A. C.; Ferreira, V. F.; Silva, F. C., 2012. Otto R. Gottlieb e as conexões com o Brasil de Ernest Wenkert. *Quím. Nova*, 35, 2317-2323.
- Poumale, H. M., Awoussong, K. P., Ranfrianasolo, R., Simo, C C. F., Ngadjui, B. T., Shiono, Y., 2012. Long-chain alkanoic acid esters of lupeol from *Dorstenia harmsiana* Engl. (Moraceae). *Nat. Prod. Res.*, 26, 749-755.
- Reis Luz, A. L. R., da Rocha, A. I., Porter, B., Wenkert, E., 1983. Alkaloids from *Microplumeria anomala*. *Phytochemistry*, 22, 2301-2304.
- Rodostitis, O. M., Gay, C., Blood, D. C., Hinchcliff, K. W., 2005. Clínica Veterinaria: um tratamento de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. Trad. WEISS, L. H. N., WEISS, R. D. N. 9<sup>a</sup>.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Saleem, M., 2009. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Lett.*, 285, 109-115.
- Sayed, A. M.; Ezzat, S. M.; Sabry, O. M., 2016. A new antibacterial lupane ester from the seeds of *Acokanthera oppositifolia* Lam. *Nat. Prod. Res.*, 4, 1-6.
- Silveira, L. M. S., Olea, R. S. G., Mesquita, J. S., Cruz, A. L. N., Mendez, J. C., 2009. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. *Rev. Bras. Farm.*, 90, 124-128.
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P. de, Mentz, L. A., Petrovick, P. R. (Org.), 1999. Farmacognosia da planta ao medicamento. 3<sup>a</sup>ed. Porto Alegre: editora Universidade/UFRGS/ editora da UFSC.
- Smith, W. B., 1978. Carbon-13 NMR Spectroscopy of steroids. *Annual reports on NMR Spectroscopy*, 8, 199-226.
- Tian, D. M., Cheng, H. Y., Jiang, M. M., Shen, W., Tang, J., Yao, X., 2016. Cardiac glycosides from the seeds of *Thevetia peruviana*. *J. Nat. Prod.*, 79, 38-50.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., Menichini, F., Giancarlo, A. S., FRANCESCO, M., 2008. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 8, 399-420.
- Von Sydow, A. C. M. D. G., Coogan, J. A., Moreno, A. M., Melville, P. A., Benites, N. R., 2006. Ocorrência de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães errantes. *Arq. Inst. Biol.*, 73, 401-407.
- Wang, C. M., Chen, H. T., Wu, Z. Y., Jhan, Y. L., Shyu, C. L., Chou, C. H., 2016. Antibacterial and synergistic activity of pentacyclic triterpenoids isolated from *Alstonia scholaris*. *Molecules*, 21, 139, 2016.

- Wansi, J. D., Chiozen, D. D., Tcho, A. T., Toze, F. A., Devkota, K. P., Ndjajou, B. L., Wandji, Sewald, N., 2010. Antimicrobial and antioxidant effects of phenolic constituents from *Klainedoxa gabonensis*. *Pharm. Biol.*, 48, 1124-1129.
- Younes, R. N., Varella, A. D., Suffredini, I. B., 2007. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extract using high throughput screening. *Clinics*, 62, 763-768.
- Zheng, X., Xu, H., Ma, X., Zhan, R., Chen, W., 2014. Triterpenoid saponin biosynthetic pathway profiling and candidate gene mining of the *Ilex asprella* root using RNA-seq. *Int. J. Mol. Sci.* 54, 5970-5987.