

## I – INTRODUÇÃO

O Brasil abriga um dos ecossistemas mais ricos do globo (ALVES et al, 2007), e a ampla biodiversidade da sua flora, aliada à sua grande extensão territorial, o tornam um dos países mais promissores do globo terrestre para a descoberta e desenvolvimento de novos bioprodutos.

Entre os diferentes biomas encontrados no território nacional, encontra-se a Caatinga, ocupando cerca de 70% da região Nordeste. O uso de plantas medicinais nessa região é consequência da herança histórica do país, pois é uma prática que sempre esteve presente nas comunidades autóctones. As origens dessa prática terapêutica datam dos primórdios da espécie humana, que sempre usou as plantas, tanto na sua alimentação quanto com fins medicinais (DA SILVA et al., 2005). Essa técnica é conhecida como fitoterapia e faz uso de matérias-primas vegetais para a produção de medicamentos com fins terapêuticos (TAUFNER, 2006).

Giulietti et al. (2002), identificaram 318 espécies botânicas endêmicas da Caatinga, e salientam que ainda existem outras por descobrir, evidenciando a precariedade do conhecimento sobre esta rica vegetação. A sua biodiversidade não é conhecida com precisão, tamanha a sua complexidade (SIMÕES e SCHENKEL, 2002).

O uso de espécies vegetais como fitoterápicos e para o controle de pragas, tanto na forma de extratos quanto seus insumos, bem como seus compostos isolados, vem crescendo progressivamente nos últimos anos e, com isso, os estudos de plantas com potencial para produção de bioprodutos, com interesse particular para as indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia e agroquímica. Entretanto, mesmo com a intensificação dos estudos relacionados às espécies vegetais com propriedades medicinais e inseticidas, pouco se conhece do ponto de vista químico e biológico das espécies da flora mundial, principalmente da brasileira.

As plantas produzem metabólitos secundários, também denominados de princípios ativos, que dentre outras funções atuam na sua proteção contra patógenos e herbívoros. Sendo assim, esses produtos podem ser uma fonte alternativa aos inseticidas e fármacos sintéticos.

Contudo, há o perigo na má utilização das plantas medicinais, já que muitas possuem naturalmente grande toxicidade. Veiga Junior et al. (2005) e Parente & Rosa (2001), descreveram a toxicidade de plantas medicinais, seja pelos efeitos adversos dos fitomedicamentos, ou por ações sinérgicas, ressaltando, assim, a importância da cautela com o

manuseio e a utilização das plantas medicinais. Sendo assim, faz-se necessário uma maior investigação sobre as propriedades terapêuticas e tecnológicas de espécies da flora brasileira.

A *Poincianella bracteosa* (Fabaceae), encontrada na região do semiárido nordestino, amplamente difundida no bioma Caatinga, é uma destas espécies de interesse, sendo muito utilizada pelas comunidades locais como planta medicinal e inseticida natural. Os trabalhos sobre a *Poincianella bracteosa* ainda são bastante incipientes, necessitando de mais pesquisas, com o objetivo de se obter informações sobre suas propriedades químicas e farmacológicas, para respaldar a sua utilização como planta medicinal e inseticida botânico.

A *Poincianella bracteosa*, conhecida popularmente como catingueira, foi escolhida para esse estudo, a partir de dados de um levantamento etnobotânico, realizado por Cunha e Silva et al. (2012), com as comunidades do entorno do município de Tanhaçu, na Bahia. A pesquisa baseou-se em uma pesquisa sobre quais as plantas medicinais a população mais utilizava para o tratamento de suas enfermidades e como inseticidas, e uma das plantas citadas foi a *Poincianella bracteosa*.

Segundo Brasileiro et al. (2008), o estudo de plantas medicinais, a partir de seu emprego pelas comunidades, pode fornecer informações úteis para a elaboração de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agronômicos sobre estas plantas, com grande economia de tempo e dinheiro.

Em vista disso, o presente trabalho teve por objetivo fazer uma prospecção química e biológica do extrato etanólico e das diferentes frações obtidas da parte aérea da *Poincianella bracteosa*, visando avaliar seus principais metabólitos secundários, bem como verificar seu potencial antibacteriano, inseticida e antioxidante através da realização de testes in vitro.

## II - REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A CAATINGA

A caatinga constitui um ecossistema exclusivamente brasileiro e está localizada nas regiões semiáridas do Brasil (Figura 1), sendo um dos biomas mais diferenciados e com maior distribuição territorial, compreendendo uma área de aproximadamente 844.453 km<sup>2</sup>, representando 11% do território nacional, com grande riqueza de espécies vegetais e animais (PALMEIRA et al., 2006). Encontra-se distribuída nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, sudoeste do Piauí e partes do interior da Bahia e do Norte de Minas Gerais, cobrindo 54,53% dos 1.548.672 km<sup>2</sup> de área da região Nordeste (ANDRADE et al., 2005).

A caatinga está geograficamente localizada em planícies e depressões acentuadas, com geologia complexa, solos argilosos e arenosos e muitas vezes rochosos (RIZZINI, 1997).

A distribuição das plantas é influenciada pela grande variedade de solos, com diferentes profundidades, baixa capacidade de retenção de água e teores de nutrientes (DIAS & KIILL, 2008).

**Figura 1:** Localização dos diferentes biomas do território brasileiro



**Fonte:** Ministério do Meio Ambiente (2004)

Segundo Ross (2008), o termo caatinga significa em Tupi “Mata Branca”, caracterizado por espécies vegetais que possuem atributos peculiares ao bioma, como matas secas, abertas e decíduais. Durante a estação seca a maioria das árvores da Caatinga perdem suas folhas e os troncos com aspecto esbranquiçado passam a dominar a paisagem (PRADO, 2003).

Silva (2009) enfatiza que o bioma caatinga é caracterizado pela fragilidade do seu ecossistema, que possui altas taxas de evapotranspiração, solos rasos e uma baixa capacidade de retenção de água, além de longos períodos de seca.

Segundo Silva et al. (2003), até meados do século XX existia uma convicção equivocada de que a caatinga possuía baixa diversidade biológica e que seria o resultado da modificação de uma formação vegetal anterior; por esse motivo foi o bioma brasileiro mais desvalorizado, devastado e pouco estudado durante o período.

De acordo com Franca-Rocha et al. (2009), apenas 21,16% do bioma caatinga é coberto por sua vegetação original. Estima-se que pelo menos 30,4% da Caatinga já tenha sido alterada, principalmente devido à ação antrópica, o desenvolvimento dos povoados, prática agropecuária e uso inadequado dos recursos naturais, sendo considerado um dos biomas mais modificados do Brasil (CASTELLETTI et al., 2003).

A biodiversidade da caatinga contribui para o desenvolvimento de diversas atividades econômicas voltadas para fins agrossilvopastoris e industriais, especialmente nos ramos farmacêutico, cosmético, químico e alimentício (MMA, 2008).

Para Hugu e Saraiva (2006), a biodiversidade da Caatinga é muito maior do que expressam os dados relatados na literatura, uma vez que 41% da região nunca foram estudados.

A caatinga possui diferentes tipos de vegetação que se restabeleceram após algum tipo de modificação, estágios de sucessão secundária, dominada por espécies herbáceas anuais e espécies lenhosas arbustivas, com um patrimônio biológico bastante diversificado e ocorrência de espécies endêmicas e uma riqueza de espécies vegetais e animais (NOVELY, 1982).

Segundo Costa et al. (2002), a caatinga possui o tipo de vegetação mais característica do semiárido nordestino, apresentando aspectos diferenciados que podem ser entendidos como respostas dos organismos ao ambiente físico, como o desenvolvimento de tolerância à seca, folhas reduzidas, folhas transformadas em espinhos, suculência e raízes tuberosas (PRADO, 2005; CHAVES e OLIVEIRA, 2004).

Para Rodal et al. (1992), a caatinga caracteriza-se por sua fisionomia xerófila e florística variadas. Esse bioma possui características restritas e peculiares, que ao longo do tempo vem

sofrendo grande degradação, necessitando assim, de estudos para conhecimento e melhor manejo das espécies. Estudos demonstram que a caatinga possui uma grande variedade de espécies vegetais e um nível elevado de endemismo, além de um alto poder de resiliência (GIULIETTE et al., 2002).

O número de estudos sobre plantas medicinais da região da caatinga tem crescido progressivamente, pois muitas espécies desse bioma são amplamente conhecidas e utilizadas na medicina popular e na produção comercial de produtos fitoterápicos (CABRAL e AGRA, 1998; ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2002).

Devido aos poucos estudos divulgados sobre a região da caatinga, há a necessidade de mais pesquisas sobre esse bioma, expandindo assim conhecimentos sobre a sua biodiversidade e mais ações para a preservação e proteção desse ecossistema.

## 2.2 *Poincianella* (Classificação e descrição)

A espécie *Poincianella bracteosa*, pertencente à família Fabaceae, subfamília *Caesalpinioideae*, é conhecida popularmente como catingueira, devido ao seu mau odor exalado, sendo sua característica marcante.

A família Fabaceae, antes denominada Leguminosae, constitui uma das maiores famílias das angiospermas, com representantes amplamente distribuídos em todo o globo, sendo reconhecidos 727 gêneros e cerca de 19.325 espécies (LEWIS et al., 2005). Para o Brasil, atualmente, são conhecidos 210 gêneros e 2.694 espécies, sendo 15 gêneros e 1.457 espécies consideradas endêmicas (LIMA et al., 2010).

A importância econômica da família Fabaceae é grande, pois apresenta grande variedade de espécies alimentícias, além de fornecer madeira de boa qualidade, ração para animais, látex, resinas, matéria-prima na fabricação de tintas, inseticidas, drogas medicinais no seu estado bruto (*Dioclea megacarpa*, *Vatairea paraensis* e *Dipteryx punctata*) e árvores ornamentais.

Essas espécies ocorrem predominantemente nos biomas Caatinga e Cerrado. A catingueira (Figura 2) apresenta caráter arbóreo de porte médio. Em geral, um indivíduo adulto pode medir de 3 a 10 metros de altura, dependendo das condições físicas e nível de perturbação do ambiente onde estão inseridos. Comumente, as árvores são de porte pequeno, devido à raridade de plantas de idade avançada e com troncos com poucos centímetros de circunferência.

**Figura 2:** Imagem da Catingueira no seu habitat natural



**Fonte:** Santos, M. R. (2013)

A catingueira é uma planta de grande importância ecológica, muito resistente à seca, cresce em locais pedregosos e arenosos, floresce rapidamente na estação chuvosa, propaga-se por sementes e rebrota com intensidade após o corte.

Segundo Da Silva et al. (2013), a catingueira tem grande destaque dentre as espécies com capacidade de brotação após o corte ou dano da parte aérea. Ao serem cortadas atingem menor porte e mais troncos. Por terem crescimento rápido, são importantes para o reflorestamento de áreas degradadas e também em projetos de paisagismo urbano.

Os troncos da catingueira são bastante utilizados para a obtenção de lenha e carvão vegetal, em construções rurais e outros usos não madeireiros, como fenagem para alimentação animal, suas cinzas são utilizadas para a fabricação de sabões e também apresenta propriedades medicinais. É considerada uma espécie pioneira com significativa importância melífera, zootécnica, farmacológica e para a produção de lenha (SANTANA et al., 2011). Não possui espinhos, suas flores são amarelas, dispostas em cachos, e as folhas divididas, com 5 a 10 folíolos alternos e oblongos, apresentando tronco estreito e de coloração acinzentada.

A catingueira é uma espécie que apresenta características importantes para a manutenção do ecossistema, pois apresenta grande quantidade de biomassa, destacando-se pela sua capacidade de armazenar carbono, que é de fundamental importância para a estrutura física do solo, facilitando o armazenamento de água. Os troncos mais velhos são utilizados por muitas espécies de abelhas sociais e solitárias, que utilizam a catingueira para construir suas colmeias (MAIA-SILVA et al, 2012).

A catingueira possui ampla utilização na medicina, sua atividade inseticida também já é reconhecida nos meios científicos (SANTOS et al, 2009).

Segundo Castro (2010), preparadas sob infusão, as folhas são utilizadas para tosse e bronquite; utilizando-se da mesma técnica de preparo, as flores funcionam como tônico estomacal e peitoral. As cascas cozidas são utilizadas para má digestão e quando imersas em cachaça, são afrodisíacas.

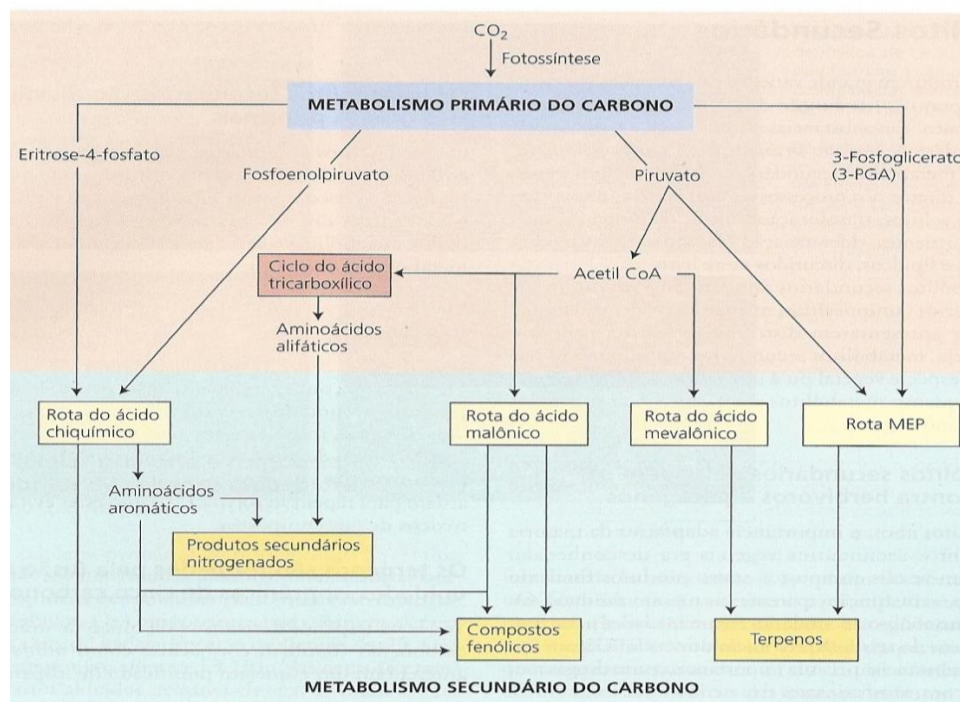
Há poucos trabalhos publicados sobre a espécie, alguns disponíveis são relacionados à sua atividade inseticida, estrutura vegetal e sua função na regeneração de áreas degradadas. O grupo de pesquisa SOMA (Sociedade e Meio Ambiente) estuda essa espécie vegetal e têm trabalhos divulgados.

## 2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O metabolismo vegetal compreende o conjunto de reações químicas que buscam o aproveitamento de nutrientes e que, continuamente, estão ocorrendo em cada célula. Estas reações visam primariamente o aproveitamento de nutrientes para satisfazer exigências energéticas e de substâncias essenciais à sobrevivência (SANTOS, 2004). A presença de atividade metabólica é uma das características dos seres vivos. Os compostos químicos formados, degradados, ou simplesmente transformados por essas reações são chamados de metabólitos (SIMÕES et al, 2004). As plantas produzem uma larga e diversa quantidade de constituintes químicos e seu metabolismo é dividido em primário e secundário (VAINSTEIN, et al, 2001).

Os metabólitos primários estão associados às suas funções vitais, pois estão relacionados ao crescimento e desenvolvimento do vegetal, reprodução celular, armazenamento de energia e outros compostos. Já os metabólitos secundários, que são derivados dos primários, têm a função de proteger as plantas contra herbívoros e patógenos, servem como atrativos para polinizadores e funcionam como fatores de competição entre plantas e de simbiose entre plantas e microrganismos (Figura 3) (TAIZ & ZEIGER, 2009).

**Figura 3:** Rotas do metabolismo primário do carbono e biossíntese dos metabólitos secundários



Fonte: Taiz e Zeiger, 2009



Os metabólitos secundários já foram considerados produtos de excreção vegetal, entretanto, sabe-se que essas substâncias são responsáveis pela adaptação dos organismos ao meio. Possuem funções biológicas importantes, como repelentes naturais, antiinflamatórios, antimicrobianos, antitumorais, e são de grande importância nas áreas farmacêutica, alimentar, agrônômica e cosmética (BARBOSA, 1994).

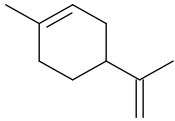
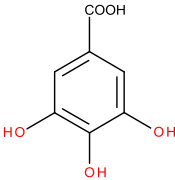
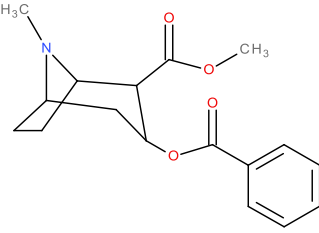
Os metabólitos secundários não são obrigatoriamente necessários aos processos básicos de crescimento dos organismos, mas têm caráter essencial em sua sobrevivência, adaptação e interação com o ambiente (VEEPORTE ALFERMANN, 2000).

Segundo Makkar et al. (2007), a produção dos metabólitos secundários constitui um mecanismo de defesa bioquímica desenvolvida pela planta contra herbívoros e outras espécies de plantas (alelopatia), ou sobre animais de diferentes filos, com efeitos tóxicos, o que do ponto de vista ecológico garante vantagens adaptativas às espécies.

Estes compostos podem atuar como antibióticos, antifúngicos, antivirais e, também, apresentar atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas. (Li et al., 1993).

Os metabólitos secundários podem ser divididos quimicamente em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (SIMÕES et al., 2007), como exemplificado na Figura 4.

**Figura 4:** Exemplos das classes dos metabólitos secundários e suas respectivas estruturas

Classe do metabólito	Exemplos	Estrutura química
Terpenos	Limoneno	
Compostos fenólicos	Ácido gálico	
Alcaloides	Cocaína	

- **TERPENOS:**

Os terpenos apresentam fórmula química geral  $(C_5H_8)_n$ . São compostos que ocorrem em todas as plantas e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural (RAVEN et al., 2001).

Os terpenos são dotados de inúmeras atividades farmacológicas, inclusive propriedades analgésicas. Há um crescente interesse na sua aplicação clínica, por apresentarem propriedades biológicas tais como antitumoral, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anti-hiperglicêmica, analgésica, anti-inflamatória e antiparasitária (PADUCH et al., 2007).

- **COMPOSTOS FENÓLICOS:**

Os compostos fenólicos (Fenóis) são substâncias amplamente distribuídas no reino vegetal e estão entre as mais difundidas classes de metabólitos secundários, sendo conhecidos pela sua grande importância no sistema solo-planta.

Estão largamente presentes na natureza como componentes naturais da madeira (lignina e tanino) e são responsáveis pelas propriedades organolépticas e cores de muitas frutas e flores (CAMPANELLA et al 1993). São responsáveis pela atividade antioxidante em frutos (HEIM et al., 2002), não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também, por serem capazes de formar radicais intermediários estáveis (CUVELIER et al.,1992; MAILLARD et al.,1996).

Os fenóis são citados como os principais responsáveis pelas propriedades antibacterianas e servem também como pigmentos de flores, agindo na proteção constitutiva contra pragas e doenças, funcionando como moléculas sinalizadoras e atuando como compostos alelopáticos, sendo componentes estruturais e funcionais da matéria orgânica do solo (SIQUEIRA et al., 1991).

- **ALCALÓIDES:**

Os alcaloides, termo que significa “semelhante aos álcalis” deriva da palavra árabe *alquali/álcali*, que significa “base”, são compostos nitrogenados, farmacologicamente ativos

e, na sua grande maioria, possuem caráter alcalino, com algumas exceções (KUTCHAN, 1995; EVANS 1996).

Segundo Pelletier (1983), um alcaloide seria uma substância orgânica de origem natural cíclica, contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. Os alcaloides podem ser sintetizados em laboratório, mas sua origem é vegetal.

Os alcalóides possuem estruturas complexas que permitem sua utilização em medicamentos, como por exemplo, os analgésicos e anestésicos. Normalmente, atuam como estimulantes do sistema nervoso central, no entanto, podem causar dependência física e psíquica.

Os mais conhecidos do grupo dos alcalóides são: cafeína, cocaína, morfina e quinina. A colchicina e a estricnina são exemplos de alcaloides venenosos para os seres humanos, pois agem como inibidores da divisão celular.

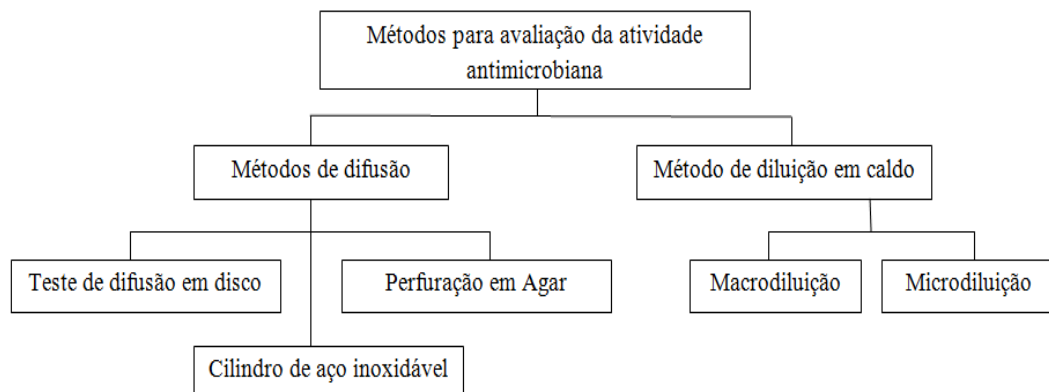
## 2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O estudo da atividade antimicrobiana de espécies vegetais vem crescendo notavelmente, tanto no Brasil quanto em outros países (RÍOS & RECIO, 2005). Segundo Ostrosky et al. (2008), várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas e direcionadas à descoberta de novos agentes antimicrobianos, provenientes de extratos e princípios ativos de plantas. O grande aumento no desenvolvimento de resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, também direciona a busca de pesquisadores e profissionais da saúde, intensificando a procura por novas alternativas terapêuticas (OLIVEIRA et al., 2007).

Muitas espécies vegetais têm sido usadas como agentes antimicrobianos, por comunidades tradicionais. Entretanto, pesquisas que comprovem as propriedades farmacológicas destas espécies são extremamente necessárias, para respaldar a sua utilização como fitoterápicos. Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais (Figura 5). Os mais conhecidos incluem o método de difusão em disco, método de macrodiluição e microdiluição (OSTROSKY et al., 2008).

A avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais e princípios ativos constitui um ensaio de grande relevância dentro das análises de prospecção biológica de plantas, dada à importância e o elevado número de doenças infecciosas que acometem o homem (COWAN, 1999; LIMA et al., 2001).

**Figura 5:** Metodologias para a avaliação da atividade antimicrobiana



**Fonte:** Adaptado do autor Ostrosky (2008)

### 2.4.1 Métodos de difusão e CIM

O método de difusão em disco, ou difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado a crescer frente a uma substância biologicamente ativa, em meio de cultura sólido (PINTO et al., 2003).

O teste de difusão é aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (BARRY & THORNSBERRY, 1991).

Consiste na aplicação de 10  $\mu$ L da solução do agente antimicrobiano em discos de papel, nas diferentes concentrações a serem testadas, de acordo com metodologia descrita por Rabanal et al. (2002) e por Karaman et al. (2003), observando se há ou não formação de halo de inibição ao redor dos discos de papel impregnados com as diferentes concentrações das substâncias.

Os halos são formados devido à capacidade que moléculas antimicrobianas possuem em inibir o crescimento dos microrganismos. São observados pela formação de uma região transparente ao redor do disco de papel. Quanto maior o halo formado, maior o efeito antimicrobiano da amostra sobre o microrganismo.

Como testes comparativos positivos e negativos são utilizados os antibióticos (padrões de referência) e os solventes com os quais as amostras são preparadas.

De acordo com o tamanho do halo os microrganismos podem ser classificados como:

- Sensível à substância microbiana: a multiplicação celular do microrganismo teste não acontece, devido à presença da substância analisada.
- Intermediário: o microrganismo é inibido somente se doses grandes são administradas.
- Resistente: quando não há inibição de crescimento.

Segundo Pinto et al. (2003), em extratos vegetais, a atividade antimicrobiana é avaliada através da determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima), que é a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento do microrganismo-teste.

Segundo Fennel et al. (2004), não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais. As variações da CIM podem estar relacionadas à técnica aplicada, microrganismo testado, modo de preparo do extrato e até mesmo da quantidade de extrato utilizada.

Portanto, os resultados obtidos passam a ser influenciados pelos micro-organismos usados para realizar o teste, pelo método selecionado e pelas características de solubilidade de cada substância (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991, VALGAS et al., 2007).

A técnica de difusão em disco foi escolhida por ser um método simples e de fácil execução e com materiais e equipamentos disponíveis.

Em relação à atividade antimicrobiana, não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais, quando comparados com antibióticos padrões, tanto que, alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial, mesmo aqueles com níveis de inibição inferiores (DUARTE, 2006).

#### **2.4.2 Bactérias**

As bactérias são microrganismos unicelulares, procariotos, com tamanho microscópico, medindo cerca de 0,2 a 1,5  $\mu\text{m}$  de comprimento. Sua organização celular é relativamente simples; considerando o aspecto estrutural geral, uma bactéria é basicamente constituída por uma membrana plasmática.

O material genético localiza-se normalmente em uma região chamada de nucleoide, havendo, em alguns casos, moléculas menores de DNA (os plasmídeos). Algumas bactérias transformadas através de processos de recombinação gênica adquirem genes capazes de fazer com que as mesmas degradem compostos, como, por exemplo, alguns fármacos, tornando-as resistente aos mesmos (GWENDOLYN, 2005).

As bactérias podem formar pares, cadeias, grupos ou outros agrupamentos, que geralmente são características de um gênero particular ou uma espécie de bactérias. Os bacilos, os cocos e os espirilos estão entre as formas mais comuns (TORTORA, 2012).

Segundo Trabulsi et al. (1999), a parede celular das bactérias Gram positivas são compostas de aproximadamente 90% de peptidoglicanos, diferindo das Gram negativas que são mais complexas e mais resistentes. Portanto, de acordo com a estrutura da parede celular bacteriana, elas serão coradas de vermelho ou violeta, de acordo com a técnica de Gram, sendo classificadas em Gram positivas ou negativas, respectivamente.

#### **2.4.2.1 *Escherichia coli***

Pertencente à família Enterobacteriaceae, a bactéria Gram negativa *Escherichia coli* é um habitante normal do intestino grosso dos vertebrados, incluindo humanos. Sua presença é benéfica, pois ajuda na produção de certas vitaminas e participa da digestão de alimentos que não seriam digeridos sem a sua presença (TORTORA, 2012).

Segundo Rubin (2006), a *E. coli* está entre os patógenos bacterianos de seres humanos que ocorre com mais frequência, provocando mais de 90% de todas as infecções do trato urinário e muitos casos de doenças diarreicas do mundo todo.

Após a adesão, *E. coli* toxigênicas produzem toxinas que induzem a hipersecreção pelas células do intestino, ou que interferem com a síntese proteica das células, acarretando diarreia nos animais (Holland, 1990; Fairbrother e Gyles, 2006).

#### **2.4.2.2 *Staphylococcus aureus***

Segundo Tortora et al (2012), *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram-positiva, é a espécie mais importante dos estafilococos, assim denominada pela pigmentação amarelada das suas colônias. Os membros dessa espécie são anaeróbicos facultativos.

Podem ser encontrados na microbiota humana, podendo causar infecções de pele, como espinhas e furúnculos. Produz muitas toxinas que contribuem para a patogenicidade da bactéria e, é um importante causador de infecções hospitalares, as chamadas infecções nosocomiais, levando a casos de choque-tóxico (GWENDOLYN, 2005).

#### **2.4.2.3 *Enterococcus faecalis***

*Enterococcus faecalis* é a espécie mais frequentemente associada com infecções em humanos (FACKLAM et al 1999). Compõem a microbiota intestinal de seres humanos e animais saudáveis e estão amplamente distribuídos no ambiente (BIAVASCO et al. 2007, CASAL et al. 2009, LÓPEZ et al. 2009, RIBOLDI et al. 2009).

Pertencente ao gênero *Enterococcus*, *E. faecalis* é a espécie mais prevalente (PORTENIER et al., 2003). São cocos Gram-positivos, que se apresentam como células de formato esférico, oval ou cocobacilar, que podem se arranjar aos pares ou em pequenas cadeias.

Na sua grande maioria são anaeróbicos facultativos, mas algumas espécies são estritamente aeróbias (PORTENIER et al., 2003).

#### **2.4.2.4 *Proteus vulgaris***

*Proteus vulgaris* são bactérias Gram-negativas que possuem forma de bastonetes e flagelos que lhes dão mobilidade. Habitam o solo, a água poluída e o trato gastrointestinal de animais. Estão frequentemente relacionadas às causas de infecções do trato urinário, mas também podem produzir graves abscessos e estão associadas com infecções hospitalares (O'Hara et al.2000 e Struble 2009).

#### **2.4.2.5 *Streptococcus pneumoniae***

O *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) é conhecido como um importante agente causal de morbidade e mortalidade em indivíduos de todas as idades (KIM et al, 1999). Segundo Tortora et al (2012), *S. pneumoniae* é um diplococo Gram-positivo encapsulado e de formato ovoide. Habitam normalmente o aparelho respiratório humano, nariz e garganta, sendo o agente causador da pneumonia estreptocócica

### **2.4.3 Crescimento bacteriano**

Em microbiologia, o crescimento microbiano está associado ao crescimento de uma população de células, e não ao tamanho da célula, onde uma célula dará origem a duas ao final de determinado tempo. A taxa de crescimento é definida pela variação do número de células por unidade de tempo.

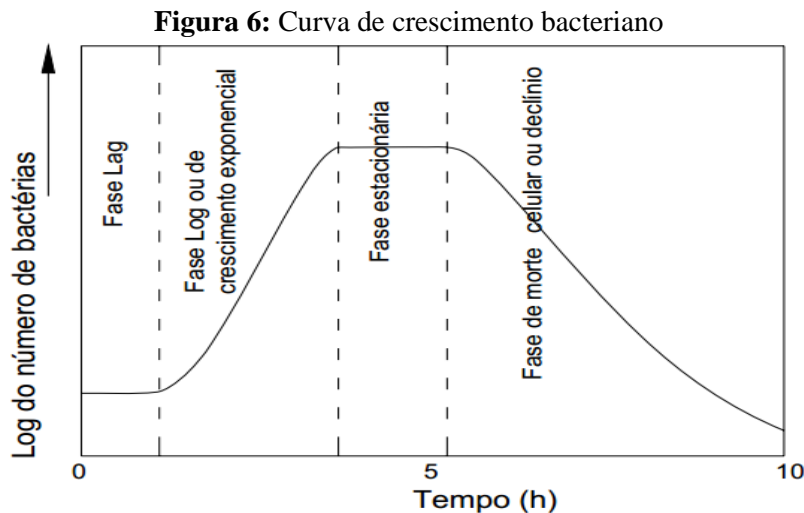
Devido à variação da taxa de crescimento microbiano ao longo do tempo, a curva de crescimento pode ser dividida em diferentes fases: a LAG; a LOG ou exponencial; fase estacionária e a fase de declínio ou morte celular (Figura 6).

Algumas espécies completam este ciclo de 4 fases em poucos dias, outras, no entanto, podem permanecer com poucas células viáveis indefinidamente (TORTORA et al., 2000).

- **Fase LAG (Latente):** Período inicial correspondente à etapa de adaptação, com intensa atividade metabólica e ausência de divisão longa. Período de tempo em que o número de células sofre pequenas variações, ainda não há reprodução celular.



- **Fase LOG (Fase exponencial):** corresponde ao período em que as células iniciam seu processo de divisão, atingindo um tempo de geração constante. É o período de maior atividade metabólica da célula e de crescimento celular.
- **Fase estacionária:** É a fase de limites, onde há o fim de alguns nutrientes e alguns produtos liberados inibem o crescimento bacteriano. Há a estabilidade de crescimento da população, o número de indivíduos que morrem é equivalente ao número de indivíduos que se desenvolvem.
- **Fase de declínio:** Etapa onde ocorre a lise celular, fase de declínio correspondente ao período em que o número de mortes excede o número de células novas, até a população desaparecer totalmente.



Fonte: TORTORA et al., 2000

#### 2.4.4 Mecanismos de resistência bacteriana

O desenvolvimento de fármacos eficientes no combate a infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas. Por outro lado, a disseminação do uso de antibióticos lamentavelmente fez com que as bactérias também desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos, com o consequente aparecimento de resistência (SILVEIRA, et al 2006).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, e está relacionado à existência de genes contidos nos microrganismos. Esses genes codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas (TAVARES, 2000). Pode ser considerado também como um fenômeno ecológico, que ocorre como resposta da bactéria

frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente. As bactérias multiplicam-se rapidamente e sofrem mutação (LEVY, 2002).

Segundo Tortora et al. (2012), os quatro principais mecanismos (Figura 7) de resistência microbiana a agentes antimicrobianos são:

- **Bloqueio da entrada da droga na célula:**

Devido à natureza de suas paredes celulares, bactérias Gram-negativas são relativamente mais resistentes a antibióticos, pois algumas bactérias são capazes de restringir a absorção de moléculas, através da alteração da permeabilidade da sua parede celular, de forma que os antibióticos são incapazes de entrar no espaço periplasmático.

- **Inativação da droga por enzimas:**

A destruição ou inativação enzimática afeta principalmente antibióticos que são produtos naturais. Grupos de antibióticos totalmente sintéticos, apresentam menor probabilidade de serem afetados dessa maneira, embora possam ser neutralizados de outras formas. Isso pode refletir simplesmente o fato de que os microrganismos tiveram pouco tempo para se adaptar a essas estruturas químicas menos familiares.

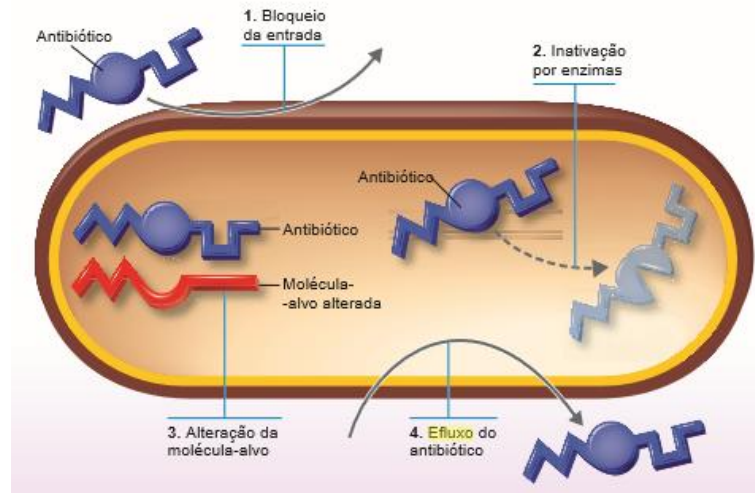
- **Alteração nos sítios-alvo da droga:**

A síntese de proteínas envolve o movimento de um ribossomo ao longo de uma fita de mRNA. Vários antibióticos possuem um modo de ação que inibe a síntese proteica nesse sítio. Pequenas modificações no sítio podem neutralizar os efeitos dos antibióticos sem que ocorram alterações significativas nas funções celulares.

- **Efluxo celular da droga:**

Certas proteínas na membrana plasmática de bactérias Gram-negativas agem como bombas que expõem os antibióticos, impedindo que alcancem uma concentração efetiva. As bactérias normalmente apresentam muitas dessas bombas de efluxo para eliminar substâncias tóxicas.

**Figura 7:** Principais mecanismos de resistência microbiana aos agentes químicos



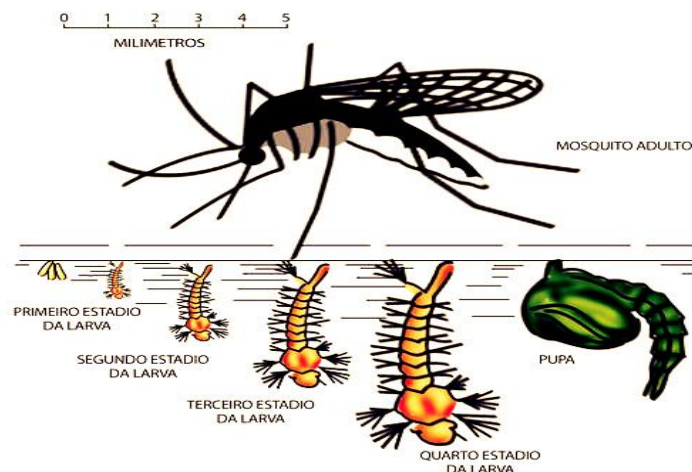
Fonte: Tortora, 2012

## 2.5 *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), conhecido como mosquito da dengue, é originário da África, onde existem populações selvagens e domésticas. Foi descrito pela primeira vez no Egito, de onde originou seu nome específico (*Aedes aegypti*). O *Ae. aegypti* foi disseminado para as Américas, durante o processo de colonização, onde desenvolveu elevado grau de sinantropia (LIMA et al., 2009; HEMME et al., 2010).

Os mosquitos geralmente possuem pequeno porte, corpo delgado e patas longas, além da presença de manchas brancas na maioria das partes do corpo. As larvas diferem-se de outros insetos aquáticos pela ausência de patas (FORATTINI, 2002; HARBACH, 2011) (Figura 8).

**Figura 8:** Ciclo evolutivo do *Aedes aegypti*



O *Aedes aegypti* é o principal vetor responsável pela transmissão dos vírus causadores da dengue, chikungunya e zika, sendo, portanto de grande importância epidemiológica. Ele possui hábitos doméstico e diurno, e utiliza-se preferencialmente de depósitos artificiais de água limpa para colocar os seus ovos. Os vírus são transmitidos pela picada do mosquito fêmea infectado. No Brasil sua existência é conhecida desde o século XVII (HALSTED et al., 1997; CDC, 2009; TAUIL, 2001).

A expansão dos mosquitos no Brasil e no mundo está associada a diversos fatores, tanto relacionados ao processo de urbanização, propícios à proliferação de criadouros através de recipientes artificiais expostos, quanto à “globalização” da economia. Tais fatores contribuem não só para a dispersão ativa do mosquito como também para a disseminação dos vários sorotipos dos vírus causadores de doenças (VASCONCELOS, 1993; FORATTINNI 2012).

Segundo Carvalho (2004), no Brasil, a principal estratégia para o controle do *Ae. aegypti* tem sido a eliminação do vetor, através do uso intensivo de inseticidas. Porém, o uso frequente desses produtos químicos pode levar ao desenvolvimento de populações resistentes dos mosquitos a estes compostos, comprometendo o controle e favorecendo a transmissão de doenças, além de causar inúmeros danos ao meio ambiente.

Assim, o surgimento de populações de mosquitos resistentes revela a necessidade de mudanças nas ações de controle e manejo destes produtos e, nesse contexto, ressalta-se a importância de estudos que visem encontrar novas formas de controle desses vetores, a exemplo do desenvolvimento dos inseticidas botânicos, integrando, assim, programas de manejo ambiental ao controle desses insetos (GARCEZ et al. 2013).

Segundo Costa et al (2005), a dengue é uma doença infecciosa aguda de curta duração podendo assumir formas graves e letais. A maneira mais usual ao seu controle é a aplicação de produtos tóxicos, o que podem resultar na resistência do mosquito e maiores danos ao meio ambiente, faz-se então assim necessário, a descobertas de novos produtos mais potencialmente ativos e menos tóxicos.

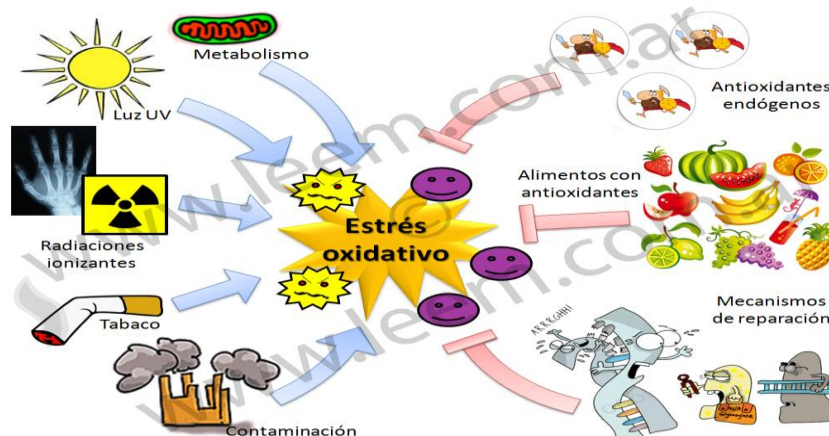
## 2.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

De acordo com Sousa et al. (2007), denominam-se antioxidantes as substâncias que, presentes em baixas concentrações, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. São substâncias que retardam ou previnem significativamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas, ao inibirem a iniciação e/ou propagação da reação de oxidação em cadeia (Figura 9) (LIMA et al., 2006).

As espécies reativas de oxigênio (EROs); que podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons; incluem todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio, os quais são eletronicamente instáveis e, por isso, altamente reativos, tendo a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos. (Agarwal et al., 2005).

A formação de radicais derivados do oxigênio em vários processos metabólicos exerce um papel importante no funcionamento do organismo. Quando em baixas concentrações, são responsáveis pelo transporte de elétrons na cadeia respiratória, atuando como moléculas sinalizadoras (DOWNLING e SIMMONS, 2009). As ERO passam a ter um efeito prejudicial ao organismo quando ocorre um aumento excessivo na sua produção ou quando há diminuição de agentes oxidantes.

**Figura 9:** Principais fatores causadores do estresse oxidativo e seus agentes antioxidantes



Os radicais livres e outros oxidantes, vem sendo considerados nos últimos anos como causadores de várias doenças, como câncer, doenças cardiovasculares, degenerativas e catarata (SOUSA et al., 2007). Quando em excesso, podem gerar o estresse oxidativo (EO),

que pode ser definido como as circunstâncias nas quais os radicais livres causam danos teciduais.

Os organismos em geral são protegidos contra os danos causados pelos radicais livres. Quando os mecanismos de proteção antioxidante se tornam ineficientes, por inúmeros fatores, resulta em doenças e aceleração do envelhecimento. Entretanto, suplementos alimentares antioxidantes podem ser usados para ajudar o corpo humano a reduzir os danos oxidativos (YANG et AL, 2000).

Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis, ou podem ser reciclados por outro antioxidante (SOUSA et al., 2006 )

O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas e alimentos, ajudam a inibir a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas. Isso tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (DROGE, 2002).

Antioxidantes podem ser classificados em dois grupos: enzimáticos e não enzimáticos. Os enzimáticos consistem das enzimas: Superóxido Dismutase (SOD), Glutationa Peroxidase (GPx) e Catalase (Cat), enquanto os não enzimáticos são representados pelos oligoelementos, vitaminas, carotenóides, flavonóides, dentre outros compostos (MARTINS, 2010).

Segundo Gulcin et al. (2003), muitas substâncias naturais, obtidas das plantas, têm sido identificadas como captadoras de espécies reativas de oxigênio, protegendo o corpo humano dos efeitos destes, bem como retardando o aparecimento de muitas doenças crônicas. Atribui-se o efeito antioxidante das plantas aromáticas à presença de grupamentos hidroxilas em seus compostos fenólicos (SHAHIDI et al., 1992).

### III - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

A parte aérea (folhas e talos) da *Poincianella bracteosa* (Figura 10) foi coletada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA) (Figura 11), unidade de conservação federal, localizada entre os municípios de Contendas do Sincorá-Ba e Tanhaçu-Ba, mesorregião do centro-sul baiano, no mês de Dezembro de 2013. As coordenadas geográficas do local de coleta foram: S: 13° 57,622'; WO: 41° 6,685'; Elevação: 1.188m; Distância 13,93; AZ: N.

**Figura 10:** Parte aérea da *Poincianella bracteosa*



**Fonte:** Santos, M. R. (2013)

**Figura 11:** Sede da Floresta Nacional Contendas do Sincorá



**Fonte:** Santos, M. R. (2013)

A FLONA tem uma área de aproximadamente 11.000 ha, altitude média de 350 m, temperatura média anual de 23°C e precipitação média anual de 596 mm. O clima da região é semiárido com alta sazonalidade e período chuvoso de novembro a abril (BRASIL, 2006).

Exsiccatas do material botânico foram encaminhadas para o Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (HUESB), para serem analisadas, identificadas e estão registradas no acervo sob n° HUESB 5894.

### **3.2 LOCAL DE EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS**

As etapas de extração e obtenção das frações a partir do material vegetal foram realizadas no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LAPRON) e a avaliação da atividade inseticida no Laboratório de Produtos Inseticidas (LAPIN), ambos vinculados ao Núcleo de Pesquisa em Química Aplicada (NUPESQ). A avaliação microbiológica foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia e a antioxidante no Núcleo de Estudos em Ciência de Alimentos (NECAL), todos pertencentes à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *Campus* Juvino Oliveira.

### **3.3 PROCESSAMENTO / PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL**

O material vegetal coletado foi levado ao Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LAPRON) para separação, pesagem e secagem. A pré-secagem foi realizada em estufa de circulação de ar a temperatura de 40°C, por um período de 48 horas, para a retirada de água e, em seguida, as folhas foram trituradas manualmente, para que a amostra adquirisse uma maior superfície de contato, facilitando, assim, a extração pelo solvente. O material vegetal foi pesado antes e após a secagem para obtenção do percentual de umidade perdido durante o processo.

### **3.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO (EE)**

O material vegetal triturado (80 g) foi colocado em um funil de separação de 2 litros, onde adicionou-se aproximadamente 2 L de solução hidroetanólica a 70%, e realizou-se a percolação exaustiva com o solvente (Figura 12).

O solvente permaneceu em contato com o material vegetal por cerca de 24 horas a temperatura ambiente, após esse período o solvente era recolhido e evaporado em evaporador



rotativo a 45°C e 80 RPM, para a obtenção do extrato etanólico. Esse processo foi repetido até que o líquido recolhido apresentasse uma coloração amarela clara. O extrato etanólico obtido foi armazenado em frasco âmbar e mantido em refrigerador a 10°C até o momento das análises.

**Figura 12:** Processo de percolação e rotaevaporação



**Fonte:** Santos, M. R. (2013)

### 3.5 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES

O extrato etanólico foi fracionado através de partição líquido-líquido utilizando-se solventes menos polares, resultando nas frações correspondentes.

Para a realização da partição foram pesadas 50 g do extrato etanólico em um béquer de 600 mL e adicionados 300 mL de solução hidroetanólica a 70%. Após solubilizar completamente o extrato, a solução foi transferida para um funil de separação de 1000 mL.

#### • Obtenção da Fração Hexânica (FH)

À solução hidroetanólica do extrato foram adicionadas porções de 200 mL de hexano, agitando-se pelas paredes do funil com cuidado, até completa extração. O processo foi repetido até completa extração, sendo utilizado aproximadamente 2 litros de hexano. Os extratos hexânicos (parte superior) foram recolhidos em um elermeyer e, posteriormente,

evaporados em evaporador rotativo a temperatura de 40°C, para obtenção da Fração Hexânica (FH). A parte inferior foi reutilizada para o fracionamento com o diclorometano.

#### • **Obtenção da Fração Diclorometânica (FD)**

A solução hidroalcoólica reservada da partição anterior foi então fracionada com porções de 100 mL de diclorometano, até completa extração, utilizando-se cerca de 700 mL de diclorometano. Para facilitar a extração, foi utilizada uma solução de NaCl saturada. Após a separação das fases, foram recolhidas as frações inferiores (diclorometânicas), e a parte superior, a hidroalcoólica, permaneceu no funil para a última etapa do fracionamento. Os extratos diclorometânicos reunidos foram evaporados em evaporador rotativo a temperatura de 40°C, para obtenção da Fração Diclorometânica (FD).

#### • **Obtenção da Fração Acetato de Etila (FAE)**

Na solução reservada da extração com o diclorometano, foram adicionadas porções de 100 mL de acetato de etila. A solução hidroalcoólica foi extraída até a exaustão, correspondendo a um volume de 500 mL de acetato de etila. Os extratos superiores foram reunidos e evaporados em evaporador rotativo a temperatura de 40°C, para obtenção da Fração Acetato de Etila (FAE).

Antes de eliminar os solventes no rotavapor, cada extrato individualmente, foi seco com sulfato de sódio anidro ( $\text{NaSO}_4$ ), filtrados em funil de vidro com o auxílio de um algodão e transferidos para um balão de fundo redondo. Os balões contendo os extratos foram então conduzidos para o evaporador rotativo, até a secagem total dos solventes. Após a completa eliminação dos solventes, os balões foram resfriados e os resíduos foram pesados para a obtenção dos pesos correspondentes das frações. Estas frações foram transferidas para frascos âmbar, identificados e guardadas em refrigerador a 10°C até o momento das análises.

### 3.6 PROSPECÇÃO QUÍMICA

Realizou-se a identificação preliminar dos constituintes químicos do extrato etanólico da *Poincianella bracteosa* e suas frações, por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se soluções reveladoras específicas para as diferentes classes de compostos orgânicos analisados.

As placas cromatográficas foram preparadas no laboratório, através da obtenção de uma suspensão, contendo 7 g de sílica gel com indicador de ultravioleta (marca Marcherey-Nagel) em 15 mL de água deionizada. Esta foi espalhada em placas de vidro de 10 x 3 cm de comprimento, com 25 mm de espessura de sílica. As cromatoplasmas foram secas por duas horas em estufa de secagem à 110°C, para ativação antes da sua utilização.

As análises qualitativas dos constituintes químicos presentes no extrato e frações foram realizadas utilizando-se soluções reveladoras preparadas de acordo com os protocolos descritos.

- Sulfato Cérico ( $\text{CeSO}_4$ ) a 1% em Ácido Sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ): pesou-se 2,5 g de  $\text{CeSO}_4$  em um béquer e adicionou-se uma quantidade de água deionizada suficiente para dissolver o soluto, transferindo o conteúdo do béquer para um balão volumétrico de 250 mL. Na capela, utilizando-se uma proveta graduada, acrescentou-se 13,6 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, e completou-se o volume com água deionizada, agitando o balão para homogeneizar a solução.
- Vanilina a 0,1% em etanol acidificado com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : em um béquer pesou-se 100 mg de vanilina e dissolveu-se com 20 mL de etanol absoluto, transferindo-se seu conteúdo para um balão volumétrico de 100 mL. Acrescentou-se 20 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado à solução, completando-se o volume com etanol.
- Ninhidrina a 0,2% em metanol: em um béquer pesou-se 0,2 g de Ninhidrina e dissolveu-se com metanol, transferindo-se para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com metanol.
- Cloreto Férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) a 0,5% em etanol: em um béquer pesou-se 0,5 g de  $\text{FeCl}_3$  e dissolveu-se com quantidade suficiente de etanol. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com etanol.
- Reagente de Dragendorff Modificado: este reagente é preparado através da mistura de duas soluções, A e B. Para preparar a solução A, dissolveu-se 1,7 g de nitrato de bismuto (III) e 20 g de ácido tartárico em 80 mL de água deionizada; a solução B foi

preparada com 16 g de iodeto de potássio dissolvidos em 40 mL de água deionizada. O reagente foi obtido misturando-se partes iguais das duas soluções. Transferiu-se 25 mL do reagente para um balão volumétrico de 100 mL, acrescentou-se 10 mL de ácido acético glacial e completou-se o volume com água deionizada.

Cada solução reveladora é responsável por identificar determinada classe de metabólito secundário, a partir da coloração apresentada na placa cromatográfica, como descrita na Figura 13.

**Figura 13:** Soluções reveladoras e classes de constituintes químicos que identificam

<b>CLASSES DE CONSTITUÍNTES QUE IDENTIFICAM</b>	<b>REVELADORES /REAGENTES</b>	<b>COLORAÇÃO APRESENTADA (RESULTADO POSITIVO)</b>
Alcaloides	Dragendorff	Azul – arroxeadado
Compostos Aminados	Nihidrina	Púrpura
Compostos Fenólicos	Cloreto Férrico	Azul escuro
Terpenoides e Esteroides	Vanilina	Azul – roxo
Sulfato Cérico	Várias classes	Diferentes cores

Em uma placa de toque, uma pequena quantidade do extrato etanólico foi solubilizada com algumas gotas de etanol, para a avaliação qualitativa dos metabólitos secundários presentes no extrato, por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), segundo as técnicas descritas por Moreira (1979), Lock de Ugaz (1988) e Matos (1997). As frações foram solubilizadas com os próprios solventes com os quais foram obtidas.

Com o auxílio de tubos capilares de vidro as amostras foram aplicadas em placas cromatográficas preparadas com sílica-gel. Para a eluição nas cubas, o extrato etanólico e a fração diclorometânica foram eluídas com acetato de etila e hexano (7:3). Para a fração de acetato de etila utilizou-se acetato de etila e acetona (8:2) e para a fração hexânica utilizou-se hexano e diclorometano (1:1).

Após a eluição, as placas foram pulverizadas com as soluções reveladoras (Figura 11) e aquecidas por 60 segundos em placa aquecedora para a análise das diferentes classes de compostos orgânicos. Após o aquecimento, ocorria a reação da substância com o revelador, formando manchas coloridas. O processo foi repetido com as frações hexânica, diclorometânica e de acetato de etila.

### **3.6.1 Teste in vitro para a identificação dos constituintes químicos:**

O extrato etanólico também foi submetido à triagem fitoquímica preliminar para a detecção das principais classes de metabólitos secundários através de reações químicas in vitro, utilizando reagentes capazes de produzir complexos coloridos e/ou precipitação característicos para cada classe de substâncias analisadas (MATOS, 1997, SIMÕES et al., 2004).

Para a realização dos testes, utilizou-se 1 g do extrato etanólico, que foi solubilizado em 100 mL de Etanol Absoluto. Porções de 5 mL dessa solução foram transferidas para diferentes tubos de ensaio enumerados e submetidos a análises de acordo com a metodologia descrita por Matos (1997), descritas a seguir.

#### **Alcalóides**

No teste para alcalóides utilizou-se dois tubos com o extrato etanólico, que foi acidificado com 10 mL de HCl 0,1 M. Logo após, adicionou-se 3 gotas de reagente de Mayer no primeiro tubo e outras 3 gotas de reagente de Dragendorff no segundo tubo. Após o procedimento observou-se a reação, o precipitado floculoso indica o resultado positivo para alcalóides.

#### **Fenóis e taninos**

O extrato etanólico foi colocado em um tubo de ensaio numerado como tubo 1. A um segundo tubo de ensaio foi adicionada apenas água destilada e solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$  e numerado como branco (tubo 2). No tubo 1 foram adicionados 3 gotas da solução de  $\text{FeCl}_3$ , agitou-se bem e observou-se a ocorrência ou não de coloração, comparando-se com o tubo 2 (branco). O resultado positivo para fenóis é indicado pela coloração entre o azul e o vermelho, quando o “branco” for negativo.

#### **Antocianinas, antocianidinas e flavonóides**

Adicionou-se em 3 tubos de ensaio 5 mL da solução hidroalcoólica do extrato etanólico. No tubo 1 acidulou-se com HCl concentrado até pH 3; no tubo 2 alcalinizou-se com solução de carbonato de sódio a 10% até pH 8,5 e no tubo 3 alcalinizou-se com solução de NaOH 1,0 M até pH 11. O aparecimento da coloração azul-púrpura e vermelho alaranjado são indicativos da presença de antocianinas, antocianidinas e flavonóides, respectivamente.

### **Heterosídeos cianogênicos**

Adicionou-se em um tubo, contendo o extrato etanólico, 2 gotas de  $H_2SO_4$  tapou-se o tubo com uma tira de papel filtro impregnado com picrato de sódio de sódio. O tubo de ensaio foi levado ao banho Maria permanecendo por 2 horas. O aparecimento da cor vermelho-castanho no papel filtro indica a presença de heterosídeos cianogênicos.

### **Flavonóis, flavonas, flavanonóis e xantonas**

Adicionou-se em um tubo de ensaio o extrato etanólico e a este colocou-se um pedaço de fita de magnésio e 0,5 mL de HCl concentrado. Foi aguardado o término da reação que foi indicada pelo fim da efervescência e observou-se a mudança de coloração. O aparecimento ou intensificação da cor vermelha é indicativo para flavonóis, flavonas, flavanonóis e/ou xantonas livres ou seus heterosídeos.

### **Catequinas**

Dissolveu-se alguns miligramas do extrato em 3mL de Metanol, filtrando se necessário. Acrescentou-se 1mL de solução aquosa de Vanilina 1% e 1mL de HCl concentrado. O resultado é indicado pelo o surgimento de uma coloração vermelha intensa indica reação positiva.

### **Glicosídeos cardíacos**

Dissolveu-se alguns miligramas do extrato em 5 mL de Metanol, filtrando se necessário. Em 2 tubos de ensaio contendo 2 mL cada, adicionou-se gotas do reativo de KEEDE. O indicativo de resultado positivo é o aparecimento da coloração azul ou violeta.

### **Esteróides e triterpenóides**

Dissolveu-se alguns miligramas do extrato em 10mL de Clorofórmio filtrando se necessário. Transferiu-se o filtrado para um tubo de ensaio completamente seco. Adicionou-se 1mL de Anidrido Acético e agitou-se suavemente, em seguida, foi adicionado cuidadosamente, 3 gotas de  $H_2SO_4$  concentrado. A solução foi agitada suavemente. O resultado positivo é observado se há rápido desenvolvimento de cores, que vão do azul evanescente, ao verde persistente.

**Saponinas**

Dissolveu-se alguns miligramas do extrato etanólico em 5mL de água destilada. Em seguida, diluiu-se para 15mL e agitou-se durante 2 minutos. Resultado: formação de espuma, se a camada de espuma permanecer estável por mais de meia hora, o resultado é considerado positivo para saponina espumílica.

**Polissacarídios**

Dissolveu-se alguns miligramas do extrato etanólico em 5mL de água destilada. Adicionou-se duas gotas de lugol. Resultado: O aparecimento de coloração azul, indica resultado positivo.

**Proteínas e aminoácidos**

Dissolveu-se alguns miligramas do extrato etanólico em 3mL de água destilada e filtrou-se o necessário. Foi adicionado 0,5mL de solução aquosa de Nihidrina a 1%, aquecer até a ebulição. Resultado: o aparecimento de coloração violeta persistente indica reação positiva.

### 3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

#### 3.7.1 Repique e preparação do meio de cultura

Para a execução do experimento, foram realizados repiques com as oitos diferentes cepas bacterianas (Figura 14) cedidas pela Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Inóculos das bactérias, guardados em eppendorfs sob refrigeração, foram transferidos para o meio de cultura e semeados em forma de estrias de esgotamento para a obtenção de colônias isoladas de bactérias.

Para o preparo das placas para repiques foram utilizados 37,5 g de BHI (Brain Heart Infusion) e 15 g de Ágar nutriente para cada 1 L de água destilada, sendo que para cada placa de petri, são necessários aproximadamente 25 mL de meio de cultura. As placas e o meio de cultura foram autoclavados previamente à sua utilização e a atividade foi executada dentro da capela de fluxo laminar para evitar possíveis contaminações.

As placas repicadas e devidamente identificadas foram levadas a estufa de incubação a 37°C por 24 horas para ativação e crescimento bacteriano.

**Figura 14:** Cepas bacterianas utilizadas nos ensaios antimicrobianos

<b>Microorganismo</b>	<b>Nº de identificação</b>
<i>ATCC Escherichia coli</i>	35288
<i>ATCC Escherichia coli</i>	25922
<i>ATCC Pneumoniae</i>	700603
<i>ATCC Proteus vulgaris</i>	-
<i>ATCC Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>ATCC Staphylococcus aureus</i>	43300
<i>ATCC Enterococcus faecalis</i>	51299
<i>ATCC Enterococcus faecalis</i>	292012



### 3.7.2 Obtenção das concentrações das amostras

Para a obtenção das diferentes concentrações de cada amostra, pesou-se 60 mg do extrato etanólico e das respectivas frações e foram diluídos individualmente em balões volumétricos de 10 mL, com o solvente correspondente, obtendo-se a concentração A (6,0 mg/mL). Essa solução foi diluída para obter-se as concentrações B (3,0 mg/mL) e C (1,5 mg/mL).

### 3.7.3 Técnica de difusão em ágar

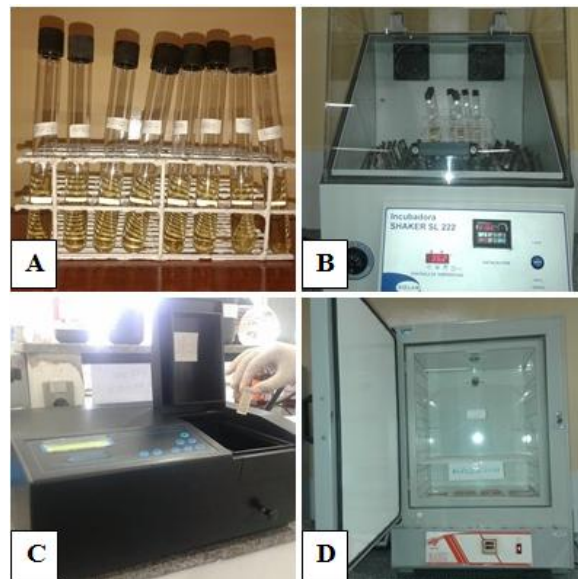
A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico e das frações da *Poincianella bracteosa* foi realizada por meio da adaptação da técnica de difusão em ágar, utilizando-se discos de papel esterilizados (BAUER et al., 1996).

Após a ativação das bactérias, inóculos isolados de cada microrganismo foram transferidos para tubos de ensaios contendo 9 mL de BHI. Estes foram incubados no Shaker (Incubadora Shaker SL 222/CFR) a 37°C a 160 RPM por um período de aproximadamente 18 horas.

Após este período, a suspensão bacteriana retirada do Shaker era diluída 10 vezes e, em seguida, realizada a leitura da densidade ótica (D.O.) da suspensão em espectrofotômetro a 600 nm. Para a calibração do aparelho foi utilizado o BHI sem a presença de bactérias (Figura 10).

Após a leitura, acertou-se a D.O. para 0,2 e, em seguida, a suspensão foi levada para incubação no Shaker (Figura 10), por mais 1 hora e realizada a segunda leitura sem diluição. Após obter a D.O. desejada (0,6 - 0,8), na fase LOG de crescimento bacteriano (Figura 15), foram colocados 1 mL da suspensão bacteriana em placas estéreis e, em seguida, foi adicionado o meio BHI semi sólido, contendo ágar (10%).

**Figura 15:** Imagens dos testes de atividade antimicrobiana



**A:** Solução bacteriana; **B:** Incubadora Shaker;  
**C:** Espectrofotômetro; **D:** Estufa incubadora

**Fonte:** SANTOS, M. R. (2014)

Discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro foram impregnados com 10  $\mu$ L das diferentes concentrações do extrato ou das frações a serem analisadas. Após a solidificação das placas, esses discos contendo as amostras em diferentes concentrações foram colocados sobre as placas cultivadas com os microrganismos. Os testes foram realizados em triplicata.

Como controles negativos utilizaram-se os solventes nos quais foram solubilizados o extrato e suas respectivas frações (EE: Etanol; FD: Diclorometano; FH: Hexano e FAE: Acetato de etila).

As placas foram levadas para uma estufa de incubação a 37°C por um período de 5 dias e, posteriormente, foram medidos os halos de inibição. As medidas dos halos foram realizadas em três dias consecutivos e repetidas novamente no quinto dia. As médias das leituras foram calculadas, os valores foram somados e divididos por 3.

Para a medição dos halos, utilizou-se régua e compasso, segundo a metodologia descrita por Wong-Leug (1988), onde foram consideradas como possuidoras de atividade antimicrobiana, as amostras que provocaram a formação de halos de inibição de tamanho igual ou superior a 10 mm de diâmetro, incluindo os milímetros dos discos de papel.

São considerados halos as áreas ao redor dos discos de papel, onde o crescimento das bactérias foi inibido após a adição do extrato/fração.

### 3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA

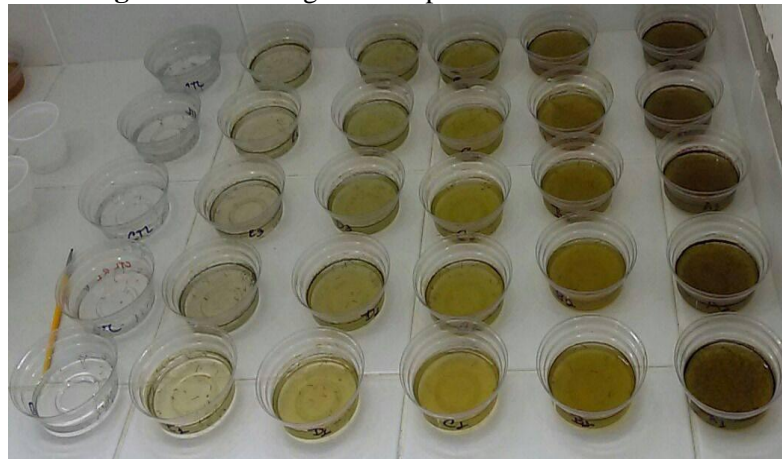
Os experimentos relativos à avaliação larvicida foram conduzidos no Laboratório de Pesquisa de Inseticidas Naturais, a partir de uma criação estoque de *Aedes aegypti*, estabelecida a partir de ovos da linhagem *Rockefeller* cedidos Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE), da Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro.

Para a avaliação da atividade larvicida utilizou-se o extrato etanólico (EE) e suas frações, diclorometânica (FD), hexânica (FH) e acetato de etila (FAE). Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada com médias de temperatura: 26,68 °C (EE), 26,64 °C (FD), 26,7 °C e 26,62 °C (AE), e umidade de 53,6%, (EE e FD), 53,6% (FH) e 53,5% (AE).

#### 3.8.1 Avaliação da atividade larvicida

Para a realização dos ensaios de atividade larvicidas utilizou-se larvas do terceiro e quarto instar do *Ae. aegypti*. Foram utilizadas cinco concentrações (2,4; 1,5; 0,9; 0,6 e 0,3 mg/mL), com cinco repetições cada. Em cada repetição foram utilizadas 30 larvas do *Ae. aegypti*. As observações da mortalidade das larvas foram realizadas nos tempos 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 24 horas, após a montagem do experimento (Figura 16).

**Figura 16:** Montagem do experimento com as larvas



Fonte: COSTA, R. K. B. S (2015)

Para a solubilização do extrato etanólico e suas frações utilizou-se os seguintes solventes: Extrato etanólico: dimetilsulfóxido (DMSO) e água deionizada (4:6); Fração diclorometânica: etanol e água (4:6); Fração hexânica: Fração acetato de etila:

dimetilsulfóxido (DMSO) e água deionizada (1:1). O grupo controle foi composto de água e solvente, sem a presença das amostras, nas mesmas proporções utilizadas para diluir o extrato e suas frações.

As observações da mortalidade larval foram realizadas nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 e 24 horas, após a montagem final do experimento. Considerou-se como mortas as larvas que não apresentavam movimento quando estimuladas com a ponta de um pincel (nº 1).

As soluções foram guardadas em frascos âmbar devidamente etiquetados sob refrigeração até a sua utilização. Como controle negativo, utilizou-se uma mistura de solvente e água nas mesmas proporções nas quais as amostras foram diluídas.

### **3.8.1 Análise estatística**

A relação entre a mortalidade larval e o tempo de exposição aos extratos, foi obtida a partir da análise de regressão linear. Para o cálculo da concentração letal 50 (CL<sub>50</sub>) foi utilizado o programa computacional Probit for Logit Analysis (POLO-PC).

### 3.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico da *Poincianella bracteosa*, utilizou-se dois diferentes métodos: Sequestro de Radicais Livres DPPH e Poder Redutor de Íons Ferro (FRAP).

#### 3.9.1 Método DPPH

Para a quantificação da atividade antioxidante pelo método DPPH, adotou-se a metodologia descrita por Rufino et al. (2006).

A solução de DPPH foi preparada pesando-se 2,4 mg do reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Sigma-Aldrich), dissolvidos em Metanol PA em balão volumétrico de 100 mL, para obter-se uma solução de concentração 0,06 mM.

Foram preparadas diluições do Extrato Etanólico em Metanol PA, de forma a obter-se as concentrações de 0,039, 0,078, 0,156, 0,3125, 0,625 e 1,25 mg/mL.

Em ambiente escuro, transferiu-se para tubos de ensaio, 3,9 mL da solução metanólica de DPPH a 0,06  $\mu$ M e 0,1 mL de cada uma das seis diferentes concentrações do extrato etanólico, homogeneizando-se as soluções em agitador de tubos.

As soluções foram mantidas em ambiente escuro a temperatura ambiente e, após 30 minutos, tempo ótimo determinado através da cinética de reação, foram feitas as leituras em espectrofotômetro UV-Vis, em comprimento de onda de 515 nm.

##### 3.9.1.1 Cinética de reação

Para a determinação do tempo ótimo de reação das amostras com o radical livre DPPH, realizou-se o monitoramento das absorbâncias a cada 10 minutos, até a observação de sua estabilização. As leituras foram realizadas em triplicata em espectrofotômetro a 515 nm. Como branco, utilizou-se a mistura de 3,9 mL da solução de DPPH e 0,1 mL de metanol PA, sem a presença do extrato.

### 3.9.1.2 Construção da curva do DPPH

A partir da solução inicial de DPPH (60  $\mu\text{M}$ ), foram preparadas, em balões volumétricos de 10 mL, soluções nas concentrações de 10 a 60  $\mu\text{M}$ , conforme descrito na Tabela 1.

**Tabela 1:** Preparo das soluções para curva do DPPH

<b>Solução de DPPH (mL)</b>	<b>Álcool metílico (mL)</b>	<b>Concentração final de DPPH (mL)</b>
0	10	0
1,7	8,3	10
3,3	6,7	20
5,0	5,0	30
6,7	3,3	40
8,3	1,7	50
10	0	60

Após um período de 30 minutos em ambiente escuro, alíquotas de cada concentração da solução de DPPH foram transferidas para uma cubeta de vidro, e realizou-se as leituras em espectrofotometro com absorvância a 515 nm. Como branco, para calibrar o espectrofotômetro, utilizou-se o alcool metílico. As médias dos valores das absorvâncias lidas foram utilizadas para a construção da equação de regressão do DPPH.

Posteriormente, o valor correspondente à metade da absorvância inicial do controle foi substituído pelo y da equação da curva do DPPH, para encontrar o consumo de DPPH em  $\mu\text{M}$  e, em seguida, transformou-se o valor para gramas de DPPH.

A partir das médias das absorvâncias obtidas com as leituras das diferentes concentrações do extrato, foi construída uma nova equação de regração, através da plotagem das absorvâncias no eixo Y e das concentrações do extrato no eixo X.

Para calcular a atividade antioxidante do extrato, substituiu-se o y da equação obtida da curva do extrato pela absorvância equivalente a 50% da concentração do DPPH e encontrou-se o resultado que corresponde à quantidade de extrato necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH, denominada de concentração efetiva ( $\text{CE}_{50}$ ). O resultado final também foi expresso em g extrato/g DPPH.

### 3.9.2 Método FRAP

A capacidade antioxidante do extrato etanólico da parte aérea da *Poincianella bracteosa* foi determinada seguindo o comunicado técnico 125 da Embrapa (2007). O objetivo deste método é avaliar o potencial dos componentes presentes no extrato em reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$ , componente do reagente FRAP, para  $\text{Fe}^{2+}$ , através da sua quantificação por método espectrofotométrico.

#### 3.9.2.1 Preparação da solução do reagente FRAP

O reagente FRAP foi obtido a partir da mistura de 25 mL de uma solução tampão acetato a 0,3M acrescido de 2,5 mL de uma solução de TPTZ (Sal de 2,4,6-Tri-(2-Piridil)-1,3,5-Triazina 1:3 com Ácido p-Toluenosulfônico) a 10  $\mu\text{M}$  e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico a 20  $\mu\text{M}$ .

#### 3.9.2.2 Preparação da solução padrão de Sulfato Ferroso a 2 $\mu\text{M}$

Dissolveu-se 27,8 mg de sulfato ferroso em 50 mL de água destilada, em balão volumétrico, e transferiu-se para um frasco de vidro âmbar devidamente etiquetado até a sua utilização.

#### 3.9.2.3 Curva Padrão do Sulfato Ferroso ( $\text{FeSO}_4$ )

A partir da solução padrão de sulfato ferroso (2  $\mu\text{M}$ ), preparou-se em balões volumétricos de 10 mL, soluções de concentrações variando de 500 a 1500  $\mu\text{M}$ , conforme a tabela 2.

**Tabela 2:** Volumes utilizados para o preparo das soluções

Solução padrão de $\text{FeSO}_4$ (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (mL)
2,5	7,5	500
5,0	5,0	1.000
7,5	2,5	1.500
10	0	2.000

Em ambiente escuro, transferiu-se alíquotas de 90  $\mu\text{L}$  de cada solução de sulfato ferroso (500  $\mu\text{M}$ , 1.000  $\mu\text{M}$ , 1.500  $\mu\text{M}$  e 2.000  $\mu\text{M}$ ) para tubos de ensaio, acrescentando 270  $\mu\text{L}$  de água e 2,7 mL do reagente FRAP, esse processo também foi utilizado para a preparação do controle positivo BHT, todos em triplicata. Manteve-se em banho-maria a 37° C, realizando-se a leitura a 595 nm após 30 minutos. Para calibrar o espectrofotômetro, utilizou-se o reagente FRAP como branco.

Os valores das absorvâncias obtidos foram inseridos no eixo Y e as concentrações de sulfato ferroso ( $\mu\text{M}$ ) no eixo X, para a construção da equação da reta.

Para a avaliação da atividade antioxidante, em ambiente escuro, transferiu-se alíquotas de 90  $\mu\text{L}$  da solução do extrato na concentração de 0,3125 mg/mL para tubos de ensaio, acrescentou-se 270  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP, e manteve-se em banho-maria a 37 °C. A leitura foi realizada a 595 nm após 30 minutos e o reagente FRAP utilizado como branco para calibrar o espectrofotômetro.

Construiu-se a curva padrão com soluções de sulfato ferroso, nas concentrações de 500,0 a 2000,0  $\mu\text{M}$ . As absorvâncias das amostras foram lidas e os resultados foram expressos em mg de  $\text{Fe}^{2+}$  / g de extrato.

### **3.9.3 Análise Estatística**

O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado (DIC) e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o pacote STAT do software Statistical Analysis System (SAS) versão 9.0.



## IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Com a extração da parte aérea da *Poincianella bracteosa* foram obtidos 180,5 g do extrato etanólico. Após seu fracionamento, a partir de 50 g do extrato etanólico, foram obtidas 5,0 g da fração hexânica (FH), 3,0 g da fração diclorometânica (FD) e 2,4 g da fração acetato de etila (FAE). O restante do extrato permaneceu dissolvido na solução hidroalcoólica. O melhor rendimento obtido foi da fração hexânica, com a 10%, seguido da fração acetato de etila, correspondente a 6% e da fração diclorometânica, com 4,8%, em relação ao extrato etanólico.

A solução restante da partição do extrato etanólico, foi denominada Fração Hidroalcoólica (FHA) e não foi utilizada nesse estudo.

### 4.2 PROSPECÇÃO QUÍMICA PRELIMINAR

Com a avaliação preliminar por CCD foi possível identificar diferentes classes de metabólitos secundários na espécie. Os resultados das placas cromatográficas foram analisados de acordo com a presença (+) ou ausência (-) dos metabólitos identificados pelos diferentes reveladores. Os resultados são mostrados na Tabela 3 e as placas cromatográficas correspondentes são mostradas na Figura 17.

As análises qualitativas dos constituintes químicos utilizando diferentes soluções reveladoras apresentaram

Segundo Dourado (2006), o conhecimento prévio dos componentes químicos encontrados nos vegetais é necessário, pois fornece a relação dos seus principais metabólitos. Uma vez que a presença de determinados grupos químicos são detectadas, direciona-se para futuras análises.

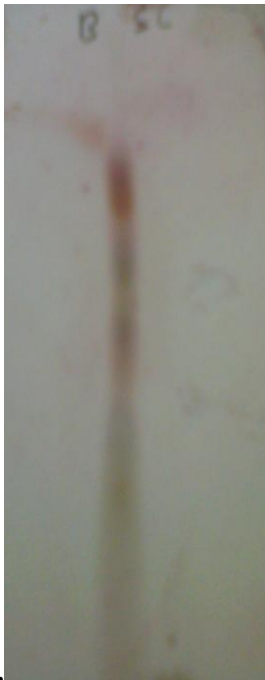
**Tabela 3:** Resultados da prospecção química por CCD

Classes de metabólitos	Resultados			
	EE	FD	FH	FAE
Alcaloides	+	+	+	+
Compostos aminados	+	-	+	-
Compostos fenólicos	+	-	+	+
Terpenoides e esteróides	-	+	-	+

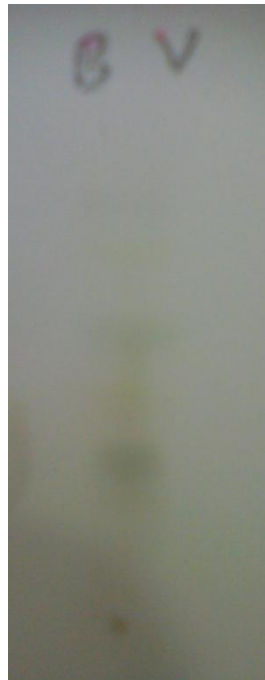
(+) Presença do metabólito (-) Ausência do metabólito

**Figura 17:** Placas cromatográficas obtidas das revelações do extrato etanólico (EE) e frações (FH, FD e FAE) com diferentes soluções reveladoras**Extrato etanólico bruto**

Sulfato Cérico



Vanilina

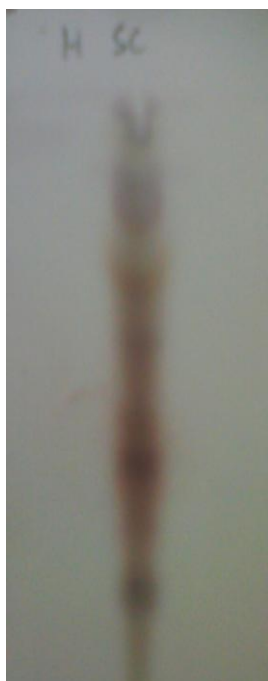


Dragendorff

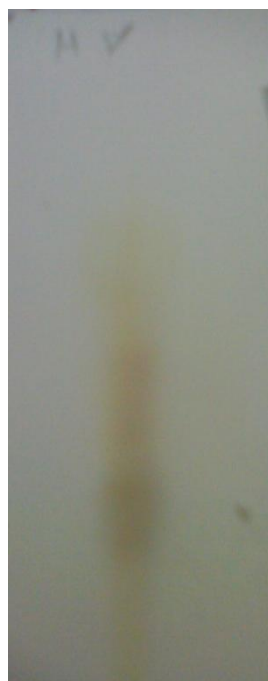


**Fração hexânica**

Sulfato Cérico



Vanilina



Dragendorff

**Fração diclorometânica**

Sulfato Cérico



Vanilina

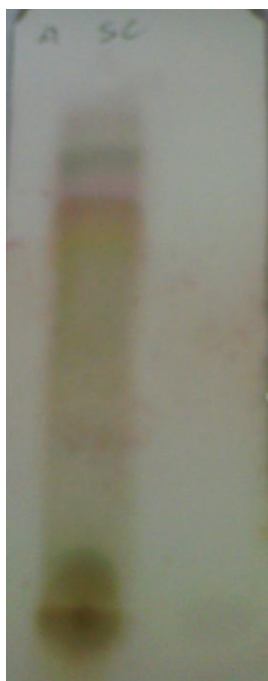


Dragendorff

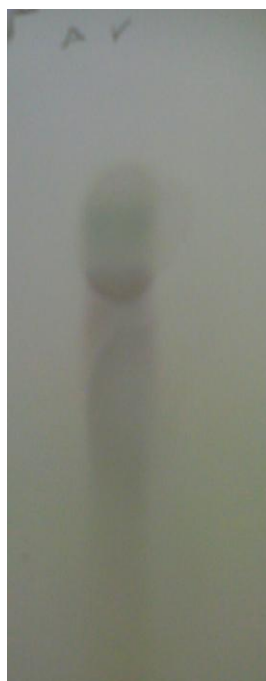


**Fração acetato de etila**

Sulfato Cérico



Vanilina



Dragendorff

**Fonte: SANTOS E PORTO (2014)**

#### 4.2.1 Teste in vitro para a identificação dos constituintes químicos:

A partir dos testes de prospecção química in vitro foram identificados os seguintes compostos, conforme apresentados na tabela 4.

**Tabela 4:** Prospecção química in vitro do extrato etanólico obtido da parte aérea de *Poincianella bracteosa*.

<b>Metabólitos secundários</b>	<b>Resultados</b>
Antocianinas	-
Antocianidinas	-
Flavonas	+
Flavanooidess	+
Xantonas	+
Flavonois	+
Saponinas	-
Polissacarídeos	-
Proteínas e aminoácidos	-
Taninos pirogálicos	+
Chalconas	-
Auronas	-
Alcalóides	-
Glicosídeos Cardíacos	-
Esteróides e triterpenóides	+
Catequinas	-
Fenóis	+
Taninos	+
Heterosídeos cianogênicos	-

### 4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

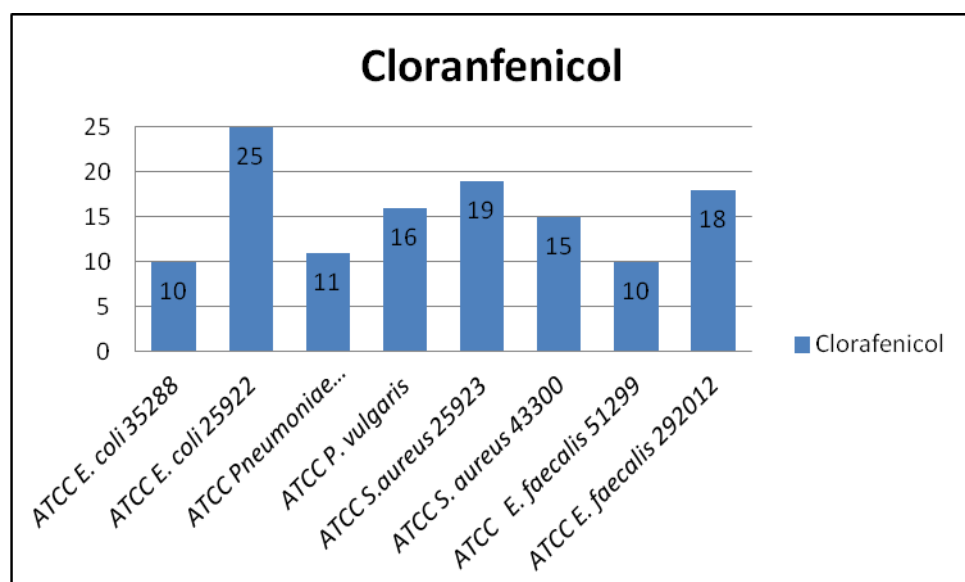
#### 4.3.1 Controles negativos e positivos

Os valores das medições dos halos de inibição para os controles negativos (solventes) variaram entre 7,0 e 8,5 mm. As cepas bacterianas foram resistentes aos controles negativos, comprovando, que os solventes não interferiram no crescimento dos microrganismos e, portanto, não interferem nos ensaios de atividade antimicrobiana.

Como controle positivo utilizou-se o antibiótico Cloranfenicol (na concentração de 3,0 mg/mL), para a avaliação comparativa das amostras frente ao padrão de referência. O Cloranfenicol é um antibiótico com amplo espectro de ação, que interfere na síntese proteica bacteriana, tanto das bactérias Gram-positivas quanto das Gram-negativas.

Os halos de inibição obtidos com as amostras tiveram tamanhos entre 10 e 25 mm (Figura 18). Mesmo sendo uma bactéria Gram-negativa e, portanto, mais resistente, a *ATCC E. coli 25922*, foi a cepa que sofreu a maior inibição pelo antibiótico, indicando sua maior susceptibilidade ao mesmo.

**Figura 18:** Tamanhos dos halos de inibição (em milímetros) obtidos nos ensaios antimicrobianos com o controle positivo (Cloranfenicol) na concentração de 3,0 mg/mL



#### 4.3.2 Extrato etanólico e suas frações:

O extrato etanólico obtido das partes aéreas da *Poincianella bracteosa* apresentou bom potencial antimicrobiano. Os halos de inibição formados tiveram tamanhos variando entre 10 e 13 milímetros. No geral, 70,83% das cepas foram inibidas pelo EE (Figura 19).

As cepas bacterianas foram bem suscetíveis ao EE que foi mais ativo frente a cepa *ATCC P. vulgaris*, pois ocorreu a formação de halo de inibição nas três concentrações testadas.

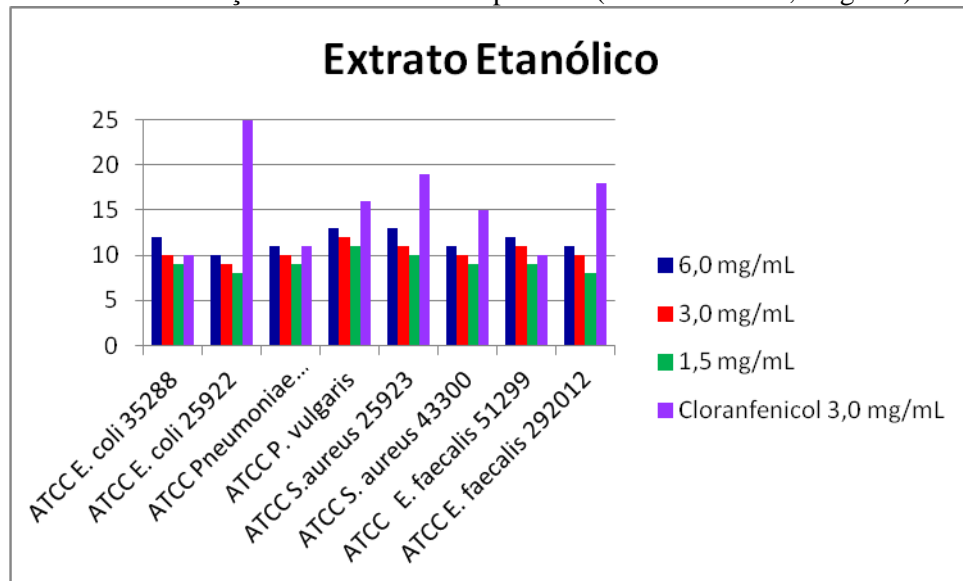
O EE provocou a formação de halos de inibição com tamanhos iguais ou superiores a 10 mm frente às cepas *ATCC P. vulgaris* e *ATCC S. aureus 25923*, na menor concentração testada, correspondente a 1,5 mg/mL.

A CIM para o EE foi de 6,0 mg/mL para a cepa *ATCC E. coli 25922*. Nas cepas *ATCC E. coli 35288*, *ATCC Pneumoniae 700603*, *ATCC S. aureus 43300*, *ATCC E. faecalis 51299* e *ATCC E. faecalis 292012* a CIM foi de 3,0 mg/mL. Já nas cepas *ATCC P. vulgaris* e *ATCC S. aureus 25923* a CIM foi de 1,5 mg/mL.

O EE apresentou na concentração de 3,0 mg/mL, frente a cepa *E. coli 35288*, um halo com tamanho igual ao do antibiótico testado e, na concentração de 6,0 mg/mL, o tamanho foi superior; na *ATCC Pneumoniae 700603*, na concentração de 6,0 mg/mL, o halo foi equivalente ao obtido com o antibiótico e na cepa *ATCC E. faecalis 51299*, nas concentrações de 3,0 e 6,0 mg/mL, os halos apresentaram tamanhos superiores ao formado pelo antibiótico, apresentando assim boa atividade antimicrobiana

Segundo Veluri et al. (2004), a presença de taninos e flavonoides pode conferir atividade antimicrobiana a um extrato, portanto, a presença desses compostos no extrato da planta, leva à expectativa de uma atividade antimicrobiana nas suas frações.

**Figura 19:** Tamanhos dos halos de inibição (em milímetros) obtidos com o Extrato Etanólico (EE) em diferentes concentrações e com o controle positivo (Cloranfenicol 3,0 mg/mL)



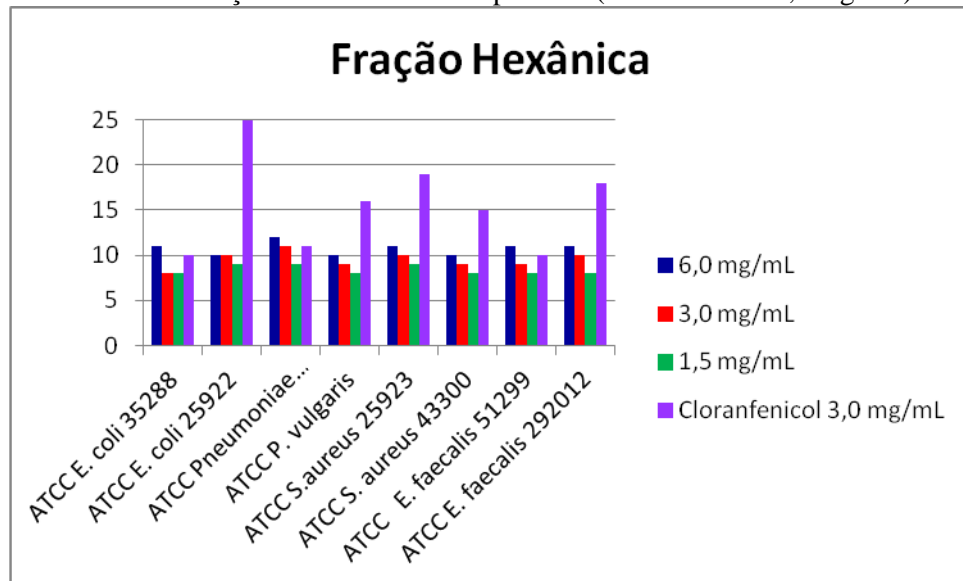
A fração hexânica foi a que apresentou o menor potencial antimicrobiano sobre as cepas bacterianas avaliadas. A CIM da FH foi de 6,0 mg/mL frente às cepas *ATCC E. coli* 35288, *ATCC P. vulgaris*, *ATCC S. aureus* 43300 e *ATCC E. faecalis* 51299. Sendo assim estas cepas bacterianas foram relativamente resistentes à FH, na maior concentração testada. Frente às cepas *ATCC E. coli* 25922, *ATCC Pneumoniae* 700603, *ATCC S. aureus* 25923 e *ATCC E. faecalis* 292012 a CIM da FH foi de 3,0 mg/mL. A FH na concentração de 1,5 mg/mL não provocou a formação de halos de inibição em nenhuma das cepas testadas, demonstrando que a mesma não apresenta potencial antimicrobiano na menor concentração testada.

Comparando-se ao Cloranfenicol, a FH produziu halos de inibição de tamanhos muitos inferiores ao antibiótico, demonstrando sua menor eficiência frente às cepas *ATCC E. coli* 25922, *ATCC P. vulgaris*, *ATCC S. aureus* 25923, *ATCC S. aureus* 43300 e *ATCC E. faecalis* 292012 (Figura 20).

Entretanto, a FH na concentração de 3,0 mg/mL, frente as cepas *ATCC E. coli* 35288, *ATCC Pneumoniae* 700603 e *ATCC E. faecalis* 51299, demonstrou resultados similares ao antibiótico, apontando assim seu potencial antimicrobiano nessa concentração, frente à estas cepas mais sensíveis.



**Figura 20:** Tamanhos dos halos de inibição (em milímetros) obtidos com a Fração Hexânica (FH) em diferentes concentrações e com o controle positivo (Cloranfenicol 3,0 mg/mL)

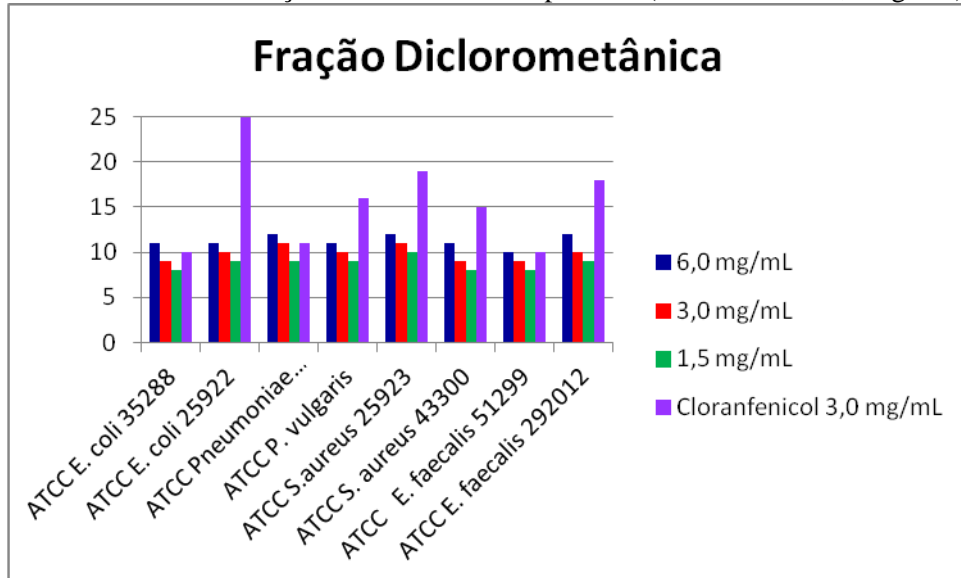


A fração diclorometânica (FD) inibiu 58,33% das 8 cepas testadas. Os halos variaram entre 10 e 12 milímetros (Figura 21). Essa também foi uma fração ativa frente à cepa *ATCC S. aureus* 25923 na menor concentração testada.

Nas cepas *ATCC E. coli* 25922, *ATCC Pneumoniae* 700603, *ATCC P. vulgaris*, *ATCC S. aureus* 25923 e *ATCC E. faecalis* 292012, a CIM da FD foi de 3,0 mg/mL. Já frente às cepas *ATCC E. coli* 35288, *ATCC S. aureus* 43300 e *ATCC E. faecalis* 51299, a CIM foi de 6,0 mg/mL. Nestes casos, os microorganismos apresentaram resistência intermediária, sendo inibidos somente na maior concentração ensaiada.

A fração Diclorometânica, através da CCD, indicou a presença de compostos fenólicos, como taninos e flavonóides. Estes possuem potencial como anti-inflamatórios, antifúngicos, antimicrobianos, agentes antioxidantes e de cicatrização de feridas (SANTOS, 2004).

**Figura 21:** Tamanhos dos halos de inibição (em milímetro) obtidos com a Fração Diclorometânica (FD) em diferentes concentrações e com o controle positivo (Cloranfenicol 3,0 mg/mL)



A Fração Acetato de Etila (FAE) apresentou um bom potencial antimicrobiano, indicado pela formação de halos de inibição de até 25 mm nos testes, como com a cepa ATCC *P. vulgaris*. A concentração inibitória mínima (CIM) para a FAE foi de 3,0 mg/mL (Figura 22), pois foi a menor concentração que inibiu 87,5% das cepas bacterianas, exceto para a cepa ATCC *Pneumoniae* 700603, para a qual a CIM da FAE foi de 6,0 mg/mL (Figura 23).

Os resultados demonstraram que as cepas bacterianas foram sensíveis frente à FAE, pois o crescimento bacteriano foi inibido com eficácia com as concentrações testadas.

Comparando-se os resultados dos testes da FAE com os do controle positivo (Cloranfenicol) (Figura 21), observou-se que a FAE produziu halos de inibição maiores que o cloranfenicol, frente às cepas ATCC *E. coli* 35288 e ATCC *E. faecalis* 51299, demonstrando o potencial antimicrobiano da fração analisada.

A FAE apresentou resultados positivos contra *S. aureus* e *E. coli*, sendo esta atividade associada à presença de substâncias fenólicas, que possuem capacidade de complexar-se a proteínas extracelulares da membrana bacteriana, provocando sua morte (COWAN, 1999).

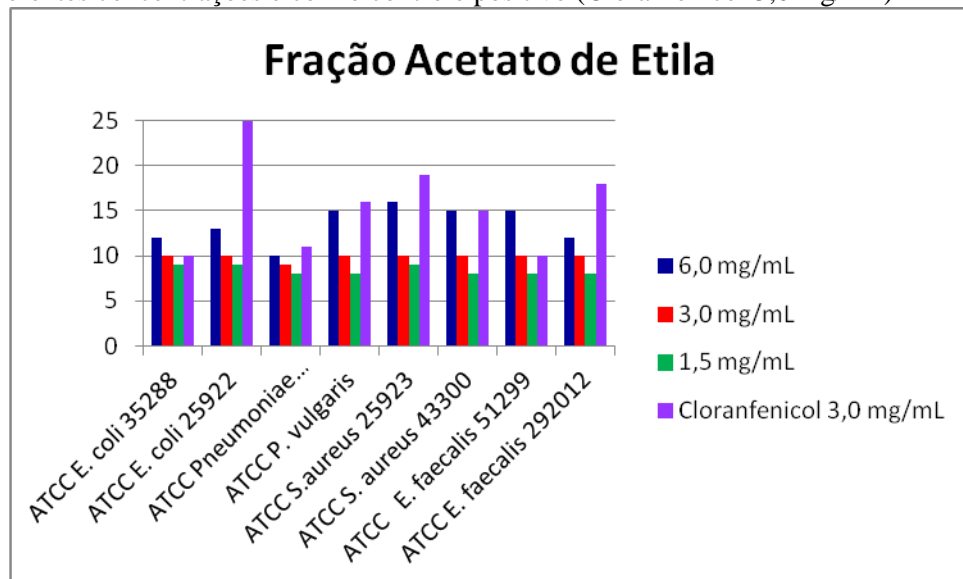
Deve-se levar em consideração, também, que a FAE é constituída por uma mistura de metabólitos secundário e que, ao serem isolados, estes poderão apresentar uma atividade melhor que o controle positivo frente às cepas avaliadas.

**Figura 22:** Formação de halo de inibição provocado pela FAE na concentração de 3,0 mg/mL, frente à cepa ATCC *S.aureus* 25923



**Fonte:** Santos, M. R. (2013)

**Figura 23:** Tamanhos dos halos de inibição (em milímetros) obtidos com a Fração Acetato de Etila (FAE) em diferentes concentrações e com o controle positivo (Cloranfenicol 3,0 mg/mL)

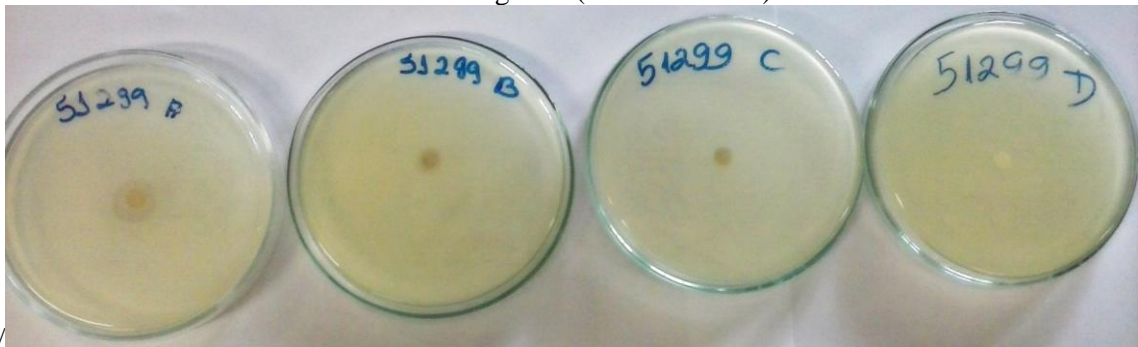


De acordo com os resultados obtidos, considera-se que o extrato etanólico e as frações obtidas das partes aéreas da *Poincianella bracteosa* têm potencial antibacteriano sobre as cepas de microrganismos testadas. Os melhores resultados encontrados foram produzidos pela FAE, onde a maioria das cepas foram inibidas na concentração de 3,0 mg/mL. A presença de compostos fenólicos e alcaloides na espécie em estudo é responsável pela atividade antibacteriana demonstrada, sendo necessário estudos mais avançados que visem o isolamento

e determinação estrutural destes constituintes químicos, bem como a realização de outros testes de atividade biológica, que auxiliem na determinação do perfil farmacológico da espécie estudada.

Na figura 24 são mostradas as placas com os testes de difusão em disco, com a amostra do extrato bruto nas diferentes frações (A: 6,0 mg/mL; B 3,0 mg/mL; e C: 1,5 mg/mL) e o controle negativo (Etanol).

**Figura 24:** Testes de difusão em disco: Fração extrato etanólico nas diferentes concentrações e com o controle negativo (solvente etanol)

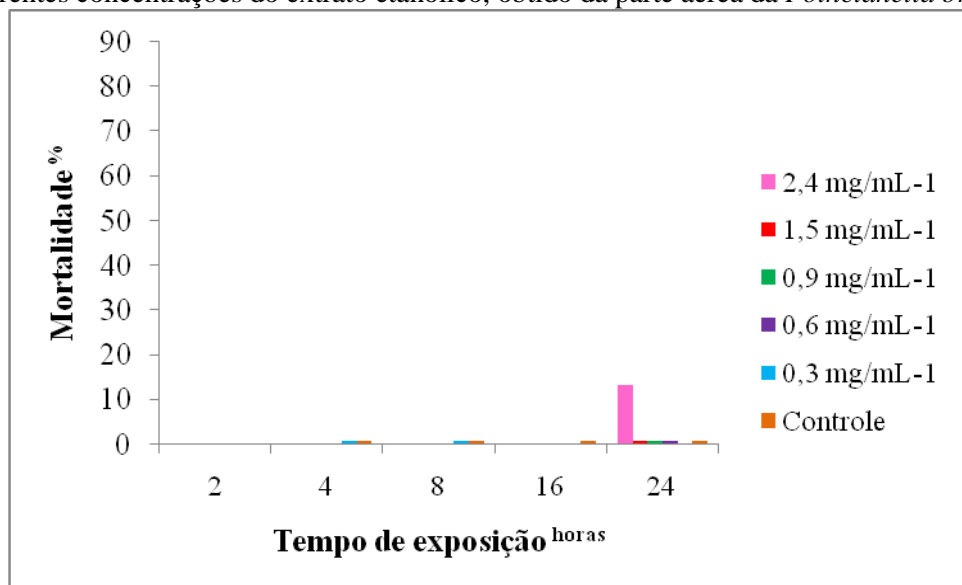


**Fonte:** Santos M. R. (2014)

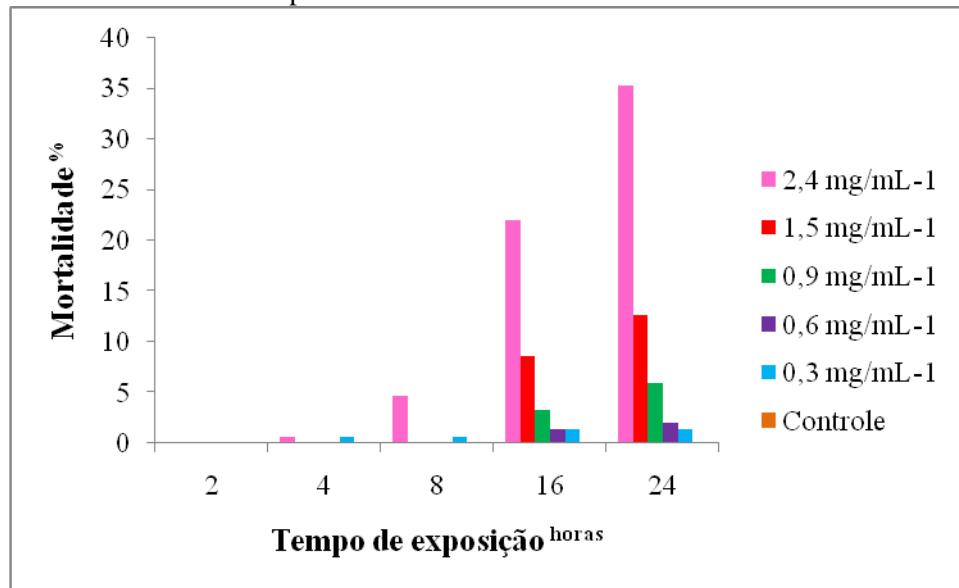
#### 4.4 ATIVIDADE LARVICIDA:

A mortalidade larval no extrato etanólico, obtido da parte aérea da *Poincianella bacteosa*, foi diretamente proporcional ao tempo de exposição nas concentrações 2,4 mg/mL ( $R^2 = 0,37$ ), 1,5 mg/mL ( $R^2 = 0,04$ ), 0,9 mg/mL ( $R^2 = 0,04$ ), 0,6 mg/mL ( $R^2 = 0,17$ ), porém não houve mortalidade na concentração 0,3 mg/mL. Contudo, embora a mortalidade tenha aumentado com o tempo de exposição das larvas, ela não ocasionou 50% de mortalidade, após 24 horas de exposição das larvas ao extrato etanólico (Figura 16). O mesmo ocorreu com a fração acetato de etila, que não atingiu, também, 50% de mortalidade larval, após 24 horas de exposição, no entanto, essa fração ocasionou um percentual de mortalidade maior que o extrato etanólico a partir de 16 horas de exposição das larvas (Figura 25).

**Figura 25:** Percentual de mortalidade das larvas do *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição às diferentes concentrações do extrato etanólico, obtido da parte aérea da *Poincianella bracteosa*

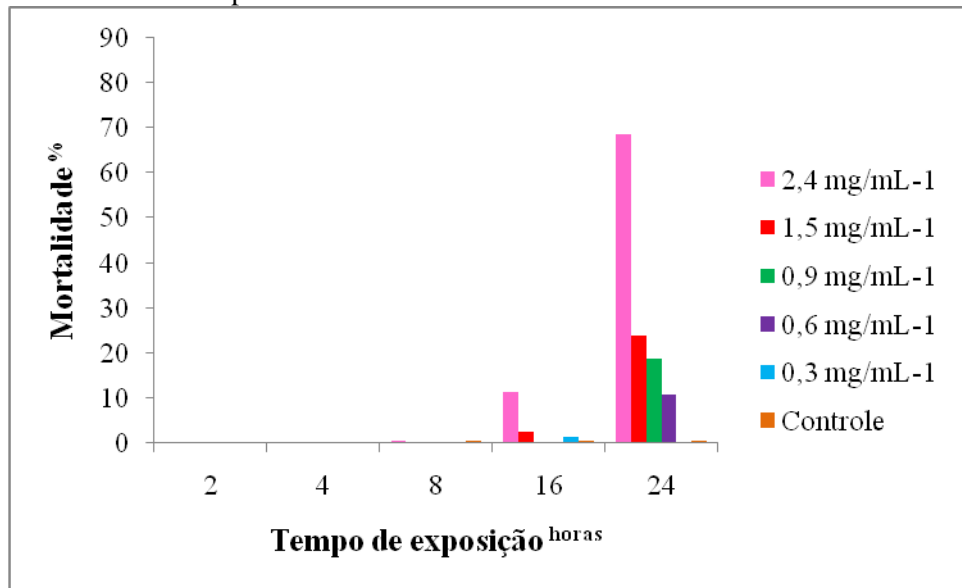


**Figura 26:** Percentual de mortalidade das larvas do *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição às diferentes concentrações da fração acetato de etila, obtida da parte aérea da *Poincianella bracteosa*, a partir do fracionamento do extrato etanólico

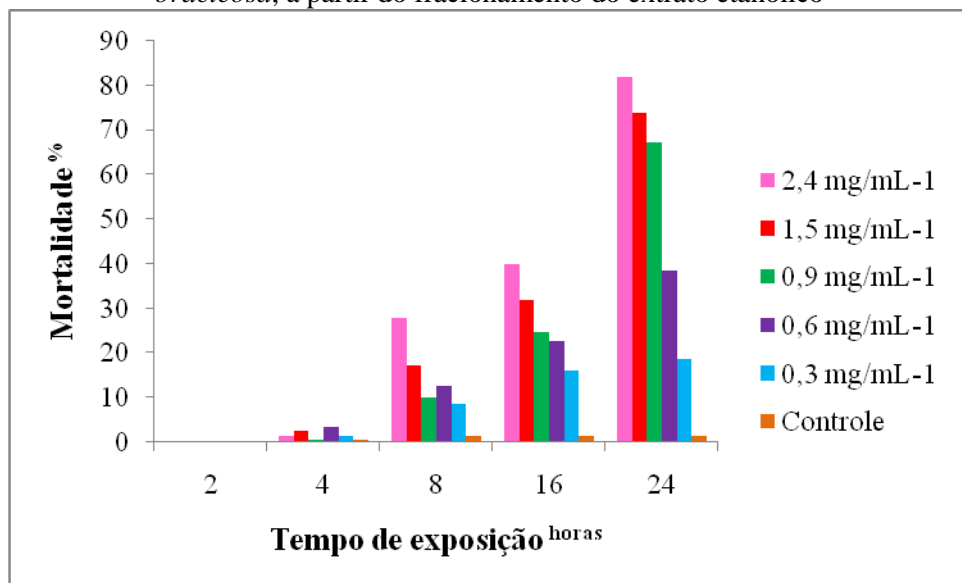


No que diz respeito às frações hexânica (2,4 mg/mL ( $R^2 = 0,48$ ), 1,5 mg/mL ( $R^2 = 0,45$ ), 0,9 mg/mL ( $R^2 = 0,37$ ), 0,6 mg/mL ( $R^2 = 0,37$ ) e 0,3 mg/mL ( $R^2 = 0,48$ ) e diclorometânica (2,4 mg/mL ( $R^2 = 0,67$ ), 1,5 mg/mL ( $R^2 = 0,66$ ), 0,9 mg/mL ( $R^2 = 0,63$ ), 0,6 mg/mL ( $R^2 = 0,86$ ) e 0,3 mg/mL ( $R^2 = 0,60$ )), a mortalidade das larvas de *Ae. aegypti* também foi diretamente proporcional ao tempo de exposição em todas as concentrações avaliadas. Contudo, diferentemente do extrato etanólico e da fração acetato de etila, ocasionaram uma mortalidade larval maior que 50%, com 24 horas de exposição das larvas (Figura 25 e 26).

**Figura 27:** Percentual de mortalidade das larvas do *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição às diferentes concentrações da fração hexânica, obtida da parte aérea da *Poincianella bracteosa*, a partir do fracionamento do extrato etanólico



**Figura 28:** Percentual de mortalidade das larvas do *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição às diferentes concentrações da fração diclorometânica, obtida da parte aérea da *Poincianella bracteosa*, a partir do fracionamento do extrato etanólico



Ao avaliar a concentração letal 50 observou-se um aumento na toxicidade com o fracionamento, visto que o extrato etanólico foi o menos tóxico para as larvas ( $5,92 \text{ mg mL}^{-1}$ ), seguido pela fração acetato de etila ( $3,78 \text{ mg mL}^{-1}$ ), a hexânica ( $2,10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e a diclorometânica ( $0,74 \text{ mg mL}^{-1}$ ), conforme apresentado na tabela 5.

**Tabela 5:** Concentração letal 50 (  $CL_{50}$  ) do extrato etanólico e de suas frações, obtidos a partir da parte aérea da *Poincianella bracteosa*, sobre larvas de *Aedes aegypti* expostas por 24 h

EXTRATO/FRAÇÕES	CONCENTRAÇÃO LETAL (mg mL <sup>-1</sup> )	
	CL <sub>50</sub>	Intervalo de Confiança
Etanólica	5.92	4.68 - 8.62
Hexânica	2.10	1.93 - 2.30
Diclorometânica	0.74	0.70 - 0.78
Acetato de etila	3.78	3.32 - 4.43

Estudos realizados pela equipe do grupo SOMA (Sociedade e Meio Ambiente) divulgaram alguns estudos da catingueira:

Cruz et al. (2012), utilizaram a raiz de *Poincianella bracteosa* com o objetivo de avaliar a propriedade larvicida da fração diclorometânica sobre o *Aedes aegypti*. Foram utilizados cinco concentrações diferentes nos ensaios biológicos, revelando que não houve diferença significativa na atividade larvicida entre as diferentes concentrações.

Amorim et al. (2012), avaliaram a propriedade larvicida da fração acetato de etila, obtida a partir do extrato etanólico das folhas de *Poincianella bracteosa*, sobre larvas do *Aedes aegypti*. Os ensaios biológicos foram realizados com cinco tratamentos (13,3 mg/mL, 6,7 mg/mL, 4,0 mg/mL, 2,0 mg/mL e 0,7 mg/mL) e observou-se que a concentração de 13,3 mg/mL foi significativamente mais efetiva que as demais concentrações, obtendo-se 67,5% de mortalidade das larvas e não ocorrendo mortalidade no grupo controle.

Cruz et al. (2012), avaliaram a ação inseticida do extrato etanólico da raiz de *Poincianella bracteosa*, sobre larvas de *Aedes aegypti*, sendo utilizadas cinco concentrações do extrato (13,3 mg/mL, 6,7 mg/mL, 4,0 mg/mL, 2,0 mg/mL e 0,7 mg/mL). A análise da concentração letal demonstrou que após algumas horas de observação, obteve-se uma mortalidade de 50% de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório.

Os autores Cruz et al. (2012) e Amorim et al. (2012), comprovaram que as diferentes partes da *Poincianella bracteosa* apresentaram potencial larvicida e inseticida sobre o *Aedes aegypti*, o que demonstra a necessidade de se dar continuidade dos estudos.



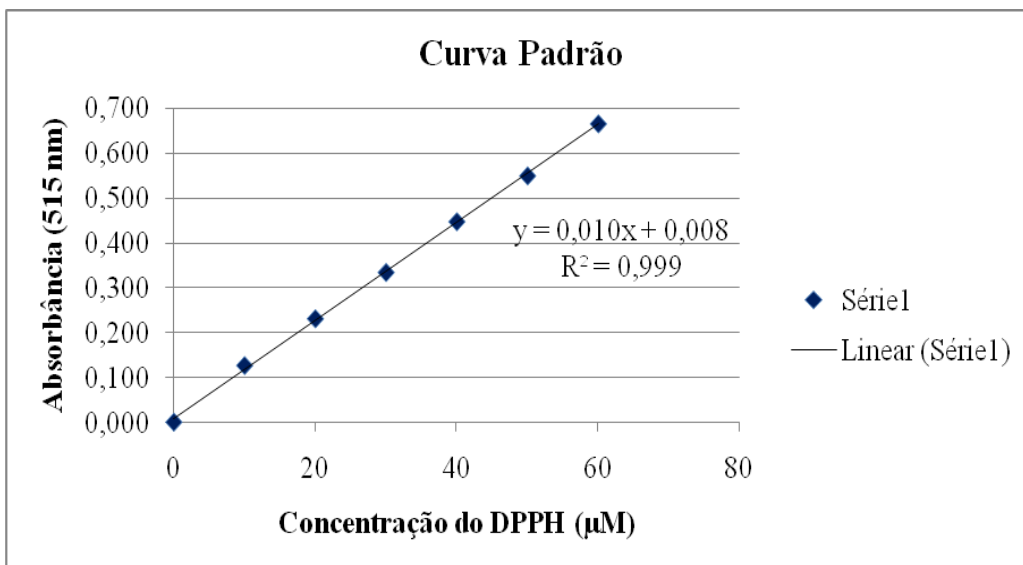
#### 4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A triagem fitoquímica preliminar, realizada pela avaliação do extrato etanólico por CCD, sugeriu a existência de substâncias com potencial atividade antioxidante na espécie. Muitas substâncias naturais, oriundas de plantas, têm sido identificadas como captadoras de espécies reativas de oxigênio, protegendo o corpo humano dos efeitos destes, bem como retardando o aparecimento de muitas doenças crônicas (GULCIN et al., 2003).

O teste do sequestro do radical livre estável DPPH baseia-se na capacidade de determinadas substâncias em doar um átomo de hidrogênio ao radical, reduzindo-o à hidrazina, provocando mudança de coloração da solução, de violeta para amarelo (Alves et al., 2010).

A Figura 29 refere-se à curva de calibração empregada para o experimento do sequestro de radicais livres DPPH.

**Figura 29:** Curva do DPPH: Absorbância x Concentração



Para a curva do DPPH obteve-se a equação da reta  $y = 0,0109x + 0,0083$  ( $R^2=0,999$ ), comparando ao BHT, controle positivo, que apresentou a reta  $y = -0,001x + 0,587$   $R^2 = 0,989$ . Segundo Alves et al. (2007), quanto maior o consumo de DPPH pela amostra, maior é sua atividade antioxidante. A capacidade antioxidante dessas plantas é explicada pela presença de substâncias capazes de inibir os radicais livres.

A atividade antioxidante foi expressa pelos valores de  $EC_{50}$ , correspondente à concentração da amostra ou padrão que causa 50% de inibição da concentração inicial dos

radicais DPPH. O valor de  $EC_{50}$  foi encontrado a partir da média das absorbâncias (0,473; 0,264 e 0,220) das três concentrações utilizadas (0, 1,5625; 0,3125 e 0,625).

Esse parâmetro estima qual é a concentração da amostra (em  $\mu\text{g/mL}$ ), necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre DPPH. O valor de  $EC_{50}$  para o extrato etanólico testado foi de 0,056 g de extrato para reduzir 1 g de DPPH.

Segundo Borguini (2006), o método DPPH é um recurso fácil e preciso para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* em extratos, frações e compostos isolados de plantas. Também é amplamente usado por requerer tempo de análise relativamente curto em relação aos outros métodos. O efeito dos antioxidantes sobre o sequestro do radical DPPH é atribuído à habilidade destes compostos de doar hidrogênio.

Durante a realização do método FRAP, o complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -TPZ é reduzido ao complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -TPZ, na presença de um antioxidante e em condições ácidas (Sucupura et al., 2012). No teste realizado pelo método FRAP, o extrato etanólico apresentou um moderado poder redutor sobre os íons  $\text{Fe}^{3+}$ , pois a quantidade de íons  $\text{Fe}^{2+}$  produzidos na solução não foram tão elevadas, correspondente a 35,485 mg de  $\text{Fe}^{2+}$  por grama de extrato.

## V - CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento desse trabalho, com a parte aérea da *Poincianella bracteosa*, concluiu-se que:

O extrato etanólico e as frações obtidas da planta inibiram o crescimento das cepas bacterianas testadas, em diferentes concentrações, demonstrando o potencial antibacteriano da espécie estudada. A fração acetato de etila, demonstrou o maior potencial antimicrobiano frente às cepas testadas.

A avaliação qualitativa do extrato etanólico por CCD demonstrou a presença de várias classes de metabólitos secundários, como por exemplo, os alcalóides, as flavonas, flavonóis, xantonas, taninos e esteróides.

O extrato etanólico da *Poincianella bracteosa* apresentou uma boa atividade antioxidante, sendo eficiente na redução de radicais DPPH e na produção de íons  $Fe^{2+}$  pelo método FRAP.

O conhecimento das propriedades antioxidantes de produtos naturais utilizados na medicina popular pode direcionar mais apropriadamente a população na escolha de plantas com maior efeito medicinal.

Na avaliação da atividade larvicida, a fração diclorometânica foi a que apresentou maior toxicidade frente as larvas do *Aedes aegypti* testadas, seguida pelas frações hexânica, acetato de etila e o extrato etanólico. Nota-se que com o fracionamento do extrato, ocorreram maiores percentuais de mortalidade das larvas, ressaltando que há uma correlação entre a mortalidade e o tempo das larvas expostas às amostras.

Diante do estudo realizado, observa-se que esse trabalho fornece parâmetros ecológicos e químicos, que podem desencadear projetos de conservação e de desenvolvimento sustentável com a flora do semiárido baiano, principalmente de Contendas do Sincorá-Ba. A utilização de espécies vegetais endêmicas da caatinga é uma fonte viável para a obtenção de bioprodutos para o controle de microorganismos e insetos.

## VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque U. P. & Andrade L. H. C. 2002. Uso de recursos vegetais da Caatinga: o caso do agreste do Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). *Interciência*, v. 7, p. 336-345
- ANDRADE, L. A.; PEREIRA, I. M.; LEITE, U. T.; BARBOSA, M. R. V. Análise da cobertura de duas fisionomias de caatinga com diferentes históricos de uso, no município de São João do Cariri, estado da Paraíba. *Cerne, Lavras* v. 11, n. 3, p. 253 - 262, 2005.
- BARBOSA, T. M. L. *Metabolismo Secundário Das Plantas Superiores e A Alelopatia*. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitotecnia, 1994. 30p.
- BARRY, A. L., G. H. MILLER, C. THORNSBERRY, R. S. HARE, R. N. JONES, R. R. LORBER, and R. FERRARESI. 1987. Influence of cation supplements on activity of netilmicin against *Pseudomonas aeruginosa* in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:1514-1518.
- BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v4, p493-496. 1966.
- Brasil. 2006. Plano de Brasil. 2006. Manejo floresta nacional Contendas do Sincorá. Volume I: Informações gerais sobre a floresta nacional. Brasília, Ministério do Meio Ambiente, IBAMA.
- BRASILEIRO, B.G. et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no "Programa de Saúde da Família", Governador Valadares, MG, Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas*, São Paulo, v. 44, n. 4, dez. 2008.
- BIAVASCO F., Foglia G., Paoletti C., Zandri G., Magi G., Guaglianone E., Sundsfjord A., Pruzzo C., Donelli G. & Facinelli B. 2007. VanA-type enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, *Tn1546* typing and location, and virulence determinants. *Appl. Environ. Microb.* 73:3307-3319.
- CABRAL S. C. M. C. & Agra M. F. 1998. Etnomedicina e farmacobotânica das Capparaceae da caatinga paraibana, Brasil. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 79, p. 2-6
- CAMPANELLA, L.; BEONE, T.; SAMMARTINO, M. P.; TOMASSETTI, M. Determination of phenol in wastes and water using an enzyme sensor. *Analyst*, v. 118, p. 979-986, 1993.
- CARVALHO, M.S.L. et al. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal. *Revista de Saúde Pública*, v.38, p.623-9, 2004.
- CASAL M.M., Cause M., Solis F., Rodriz F. & Casal M. 2009. Investigación de las resistências a antimicrobianos en *Enterococcus faecalis*. *Revta Esp. Quimioter.* 22:117-119.
- CASTELLETTI, C.H.M.; SANTOS, A.M.M.; CASTELLETTI, C.H.M.; SANTOS, A.M.M.; TABARELLI, M; SILVA J.M.C. 2003. TABARELLI, M; Silva J.M.C. TABARELLI, M;

SILVA J.M.C. 2003. 2003. Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. In: Leal, I.R.; Tabarelli, M.; Silva, J.M.C. (eds). Ecologia e conservação da Caatinga. Recife, Editora UFPE, p. 719-734.

CASTRO, A. S. Flores da caatinga. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido, 2010. 116p. : il. ISBN: 978-85-64265-00-4 Edição Bilingue 1. Flores – caatinga. 2. Semiárido. I. Cavalcante, Arnóbio.

CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*, v.55, n.407, p.2365-2384, 2004.

COSTA, J. A. S.; NUNES, T. S.; FERREIRA, A. P. L.; STRADMANN, M. T. S; QUEIROZ, L. P. Leguminosas forrageiras da Caatinga: espécies importantes para comunidades rurais do sertão da Bahia. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, SASOP, 2002.

CUNHA, S. L. et al. Plantas Medicinais Usadas Pela Comunidade Do Povoado De Laços (Tanhaçu/Bahia) E Encontradas Na Floresta Nacional Contendas Do Sincorá. *Revista Caatinga*, v. 25, n. 3, p. 130-136, 2012.

CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Comparison of the antioxidant activity of some acid phenols: structure-activity relationship. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, Benkyoku, v.59, p.324-325,1992.

COWAN, N. M. Plant Products As Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.*,v. 12, n. 4, p. 564 – 582, 1999.

DA SILVA, M. P. L.; ALMASSY JUNIOR, A. A.; DA SILVA . F.; DA SILVA, M. Levantamento etnobotânico e etnofarmacológico de plantas medicinais utilizadas por comunidades rurais de mutuípe-BA integrantes do “Projeto Ervas”.

DIAS, C. T. de V. KIILL, L. H. P. Levantamento florístico da reserva legal do Projeto Salitre, Juazeiro-BA. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido, 2008. 25 p. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br.htm>>

DOURADO, R.S. Isolamento de compostos secundários em extratos de caules e folhas de *Hypericumcordatum* (Vell. Conc.) N. Robson (Clusiaceae). 104f. (Dissertação – Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, 2006.

DROGE W 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. *MultiCiência* (2006).

EVANS, W. C. Trease and Evan’s Pharmacognosy, 14 ed. London: W B Saunders, 1996. 612 p.

- FACKLAM, R. R.; COLLINS, M. D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol*, v. 27, p. 731-4, 1999.
- FAIRBROTHER, J.M.; GYLES, C.L. *Escherichia coli* infections. In: STRAW, B.E.; ZIMMERMAN, J.J.; D'ALLAIRE, S. et al. (Ed). *Disease of Swine*. Oxford: Blacwell Science, 2006. p. 639-674.
- FENNEL C. W., LINDSEY K. L, M. C GAW LJ, SPARG SG, STAFFORD GI, ELGORASHI EE, GRACE OM, VAN STADEN J 2004. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *J. Ethnopharmacol* 94: 205-217.
- FORATTINI OP. *Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia*. São Paulo: Edusp; 2002.
- FRANCA-ROCHA, W. J. S. Situação da cobertura vegetal do bioma Caatinga. In: ANGELOTTI, F.; SÁ, I. B.; MENEZES, E. A.; PELLEGRINO, G. Q. (Ed.). *Mudanças climáticas e desertificação no semi-árido brasileiro*. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2009. p. 77-93.
- GIULIETTI, A.M., R.M. HARLEY, L.P. QUEIROZ, M.R.V. BARBOSA, A.L. BOCAGE NETA & M.A. FIGUEIREDO. 2002. Espécies Endêmicas Das Caatingas. p. 103-118
- GÜLCIN I, Oktay M, Kirecci E, Küfrevioğlu OI 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L) seed extracts. *Food Chem* 83: 371-382.
- GWENDOLYN, P. G. Engelkirk; Burton R. *Microbiologia para as Ciências da Saúde*. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- HALSTEAD, S. B. Dengue vírus-mosquito interactions. *Annual Review of Entomology*, v. 53, p. 273-91, 2008.
- HOLAND, R.E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.3, p.345-375, 1990.
- HUGO, Alesandra. SARAIVA, Matheus. Um Ecossistema Legitimamente Brasileiro. Disponível em: [http://www.unilasalle.edu.br/arquivos/grad\\_uacao/biologia/docs/manejo\\_2.pdf](http://www.unilasalle.edu.br/arquivos/grad_uacao/biologia/docs/manejo_2.pdf).
- KARAMAN İ, ŞAHİN F, GÜLLÜCE M, ÖĞÜTÇÜ H, ŞENGÜL M, ADIGÜZEL A 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol* 85: 231-235.
- KUTCHAN, T. Alkaloid Biosynthesis-The Basis for Metabolic Engineering of medicinal Plants. *Plant Cell*, v. 7, p. 1059-1070, 1995.
- LEVY SB. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002. 49(1):25-30.
- LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B. & LOCK, M. *Legumes of the World*. The Royal Botanic Gardens, Kew, 577p. 2005.

Li J, Ou-Lee TM, Raba R, Amundson RG, Last RL 1993. Arabidopsis mutants are hypersensitive to UV-B radiation. *Plant Cell* 5: 171-179.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Orgs.). Plantas medicinais: sob a óptica da química medicinal moderna. Chapecó: ARGOS, p. 483 – 501, 2001.

LIMA AR, Barbosa VC, Santos Filho PR, Gouvêa CMCP. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. *Rev Bras Farmacog.* 2006; 16:531-6.

LIMA, W. P.; CHIARAVALLOTTI NETO, F.; MACORIS, M. L. G.; ZUCCARI, D. A. P. C.; DIBO, M. R. Estabelecimento de metodologia para alimentação de *Aedes aegypti* ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p. 2014 448 em camundongos e avaliação da toxicidade do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre o *Aedes aegypti*. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba*, v. 42, n. 6, p. 638-641, 2009.

LOCK de UGAZ, O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú, 1988. p. 1-7.

LÓPEZ M., Sáenz Y., Rojo-Bezares B., Martínez S., del Campo R., Ruiz-Larrea F., Zarazaga M. & Torres C. 2009. Detection of *vanA* and *vanB2*-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. *Int. J. Food Microbiol.* 133:172-178.

MAIA-SILVA, C., Hrcir, M., Silva, C.I. & Imperatriz-Fonseca, V.L. 2010. Estratégias de forrageamento de *Melipona subnitida* na Caatinga: a coleta de pólen em fontes lucrativas. In: X Congresso Ibero-latino Americano de Apicultura, Natal-RN.

MAILLARD, M.N.; SOUM, M. H.; BOIVIA, P.; BERSET, C. Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, London*, v. 3, p. 238-244, 1996.

MAKKAR, H. P.S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Plant Secondary Metabolites. Institute for Animal Production in the Tropics and Subtropics, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany, v.393, p.129, 2007.

MARTINS, Carolina de Aguiar. Avaliação da Atividade Antioxidante in vitro e in vivo do Guaraná (*Paullinia cupana*) em pó. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo.

MATOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141 p.

Ministério do Meio Ambiente (MMA); Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO) & The Nature Conservancy (TNC). Hauff, S. N. [org.]. Mapa das Unidades de Conservação e Terras Indígenas do Bioma Caatinga, Brasília. 2008.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. *Trib. Farmac.*, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (Approved standard M7-A6). 6 Ed: Wayne, 1-47, 2003.

NOVELY, P. E. Aspectos do efeito do superpastoreio na produção e manejo de pastagem nativa no Nordeste do Brasil. In: SEMANA BRASILEIRA DE CAPRINOS, 2., 1982, Sobral. Anais...Sobral: 1982. p.7-18.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 689-702. 2009.

OLIVEIRA, F. Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, n.3, p.466-76, 2007

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev.Bras. Farmacogn. João Pessoa*, v. 18, n. 2, 301-307. 2008.

PADUCH, R. et al. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 55, n. 5, p. 315–327, 2007.

PALMEIRA-JR, R. S. F.; ALVES, F. S. M.; VIEIRA, L. F. A.; CONVERSA, L. M.; LEMOS, R. P. L. Constituintes químicos das folhas de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v 16, 2006.

PARENTE, C. E. T.; ROSA, M. M. T. Plantas comercializadas no município de Barra do Piraí, RJ. *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v. 52, n. 80, p. 47-59, 2001.

PELLETIER, S.W. ed. (1983-1988) *Alkaloids Chemical and Biological Perspectives*, Vol 1-6, New York, USA, Willey

PHILLIPSON, G. W.; ANDERSON, A. C. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 25, p. 61.

PRADO, D. As caatingas da América do Sul. Pp 3–73. In *Ecologia e conservação da Caatinga*. Editores: I. R. Leal, M. Tabarelli e J. M. C. Silva. Recife: Editora Universitária - Universidade Federal de Pernambuco. 2003. 3-73 pp. p. 3. 1998.

PINTO T. J. A., KANEKO T. M., OHARA M. T. 2003. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p.

PORTENIER I., WALTIMO T.M.T., ØRSTAVIK D., HAAPASALO. M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and Chlorhexidine Digluconate With or Without Cetrimide in the Presence or Absence of Dentine Powder or BSA. *J Endod* 2006; v. 32, n. 2: p. 138-41.

PRADO, D. E. As Caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. da (Ed.). *Ecologia e Conservação da Caatinga*. 2 ed. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2005. p. 3-74.



RABANAL RM, ARIAS A, PRADO B, HERNÁNDEZ-PÉREZ M, SÁNCHEZ-MATEO CC 2002. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. *J Ethnopharmacol* 81: 287-292.

RAVEN, P. H, EICKHORN, S. E. & EVERT, R. F. *Biologia Vegetal*. 6ª ed. Editora: Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, 2001, 906p.

RATES S. M. K. 2001. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. *Rev Bras Farmacogn* 11: 57-69.

RIBOLDI G.P., Frazzon J., Azevedo P.A. & Frazzon A.P.G. 2009. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 40:125-128.

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

RIZZINI, C. T. 1997. Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos, 2ª ed. Âmbito Cultural, Rio de Janeiro.

ROSS, J. S. Os grandes domínios de vegetação: o caso brasileiro. *Geografia do Brasil*. 5. ed. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo: 2008. p 174-179.

RUBIN, E. Patologia: Bases clínico patológicas da medicina. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

RUFINO, M. S. M. Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais. 2008. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2008.

SANTANA, J. A. S.; VIEIRA, F. A.; PACHECO, M. V.; OLIVEIRA, P. R. S. Padrão de distribuição e estrutura diamétrica de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Catingueira) na Caatinga do Seridó. *Revista de Biologia e Ciências da Terra, Campina Grande*, v.11, n. 1, p. 116-122, 2011. <[http://eduep.uepb.edu.br/rbct/sumarios/pdf/Artigo\\_BioTerra\\_V11\\_N1\\_2011\\_13.pdf](http://eduep.uepb.edu.br/rbct/sumarios/pdf/Artigo_BioTerra_V11_N1_2011_13.pdf) .

SANTOS, R. I. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004. 1102 p.

SANTOS, R. C. S. et al. Atividade Antimicrobiana E Potencial Larvicida Do Extrato Hexanólico Do Cerne Da Catingueira (*Caesalpinia Pyramidalis*. Tul). IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. Recife-Pe, 2009.

SILVA, J. M. C. da et al. Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente: Universidade Federal de Pernambuco. 2003. p. 47-78

Silva, A. P. N.; Moura, G. B. A.; Giongo, P. R.; Silva, A. O. Dinâmica espaço-temporal da vegetação no semi-árido de Pernambuco. *Revista Caatinga*. Natal, v. 22, n. 4, p. 195-205, 2009.

SILVEIRA, Gustavo Pozza.; NOME, Faruk.; SÁ, Marcus Mandolesi.; TERENCEI, Hernán. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 4, 844-855, 2006.

SIMÕES C. M. O., SCHENKEL E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Rev Bras Farmacogn*. 2002; 12(1):35-40.

SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UF SC, 2004. 821p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.

SIQUEIRA J. O., NAIR M. G., HAMMERSCHMIDT R, SAFIR G. R. 1991. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10(1):63-121.

SOUSA, C. M. de M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

Souza CRF, Georgetti SR, Salvador MJ, Fonseca MJVF, Oliveira WPO. Antioxidant activity and physical-chemical properties of spray and spouted bed dried extracts of *Bauhinia forficata*. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 45(2), 2009.

TAIZ, L; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 848 p

TAUFNER, C. F.; FERRAÇO, E. B.; RIBEIRO, L. F. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia, ES. *Natureza on line* 4(1): 30-39. [online]. Santa Tereza, 2006.

TAVARES, Walter. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [online]. 2000, vol.33, n.3, pp. 281-301. ISSN 0037-8682.

TORTORA, G.J. et al. *Microbiologia*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. *Microbiologia* 3ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

VAINSTEIN, A.; LEWINOHN, E.; PICHERSKY, E.; WISS, D. Floral fragrance. New inroads into and old commodity. *Plant Physiology*, 127:1383-1389, 2001.

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.D. (Eds.). *Methods in Plant Biochemistry*. London: Academic Press, 1991. p. 47-69.

VEERPORTE, ALFERMANN; Metabolic engineering of plant secondary metabolism. Kluwer Academic Publishers , Dordrecht, 2000.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? Química Nova, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005

VASCONCELOS, P.F.C. Epidemia de febre clássica de dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaína, Tocantins, Brasil. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, n.35, p.141-8, 1993.

Veluri R, Weir TL, Bais HP, Stermitz FR, Vivanco JM. Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. J Agric Food Chem. 2004; 52:1077-82.

YANG, C. S., LANDAU, J. M., HUANG, M.-T., NEMARK, H. L. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic copuns. Annual Review of Nutrition, v. 21, p. 381-406.