

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS

**Estudo químico e microbiológico de *Gallesia integrifolia* (Spreng)
Harms. (Phytolaccaceae)**

Mestranda: Fernanda da Silva Neves

Orientador: prof. Dr. Rodrigo Rodrigues de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES

FEVEREIRO/2012

FERNANDA DA SILVA NEVES

Estudo químico e microbiológico de *Gallesia integrifolia* (Spreng)
Harms. (Phytolaccaceae)

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do grau de mestre em Ciências Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues de Oliveira

Campos dos Goytacazes

Fevereiro/2012

FERNANDA DA SILVA NEVES

Estudo químico e microbiológico de *Gallesia integrifolia* (Spreng) Harms. (Phytolaccaceae)

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do grau de mestre em Ciências Naturais.

Aprovado em 27 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

Rodrigo Rodrigues de Oliveira (Orientador)
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Danilo Ribeiro de Oliveira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Daniela Barros de Oliveira
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Oney Vieira da Motta
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Campos dos Goytacazes
Fevereiro / 2012

Aos meus pais, Jorge e Antonia, que com muito amor, me ensinaram o verdadeiro valor da luta e da conquista. E ao meu namorado, pelo companheirismo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao único que é digno de receber a honra e a glória, a força e poder, ao **Deus** eterno imortal, invisível, mas real, a Ele agradeço de todo meu coração.

Aos meus pais, Jorge e Antonia, por sempre priorizar a minha educação.

Ao meu orientador Rodrigo pela orientação e ensinamentos durante este trabalho.

Ao Wallace, meu amor, que com sua paciência e compreensão me permitiu dedicar grande parte do tempo que era seu, nesta pesquisa. Obrigada por me apoiar em todos os momentos da minha vida. A você, todo meu carinho e amor.

A toda minha família e amigos.

Aos amigos do laboratório de Química de Produtos naturais, Adriana, Diego, Fernanda Tavares, Queitilane, Amaro, Nayara e Virgínia, pelo convívio, alegrias compartilhadas e cumplicidade.

Ao professor Olney Vieira Motta do Laboratório de Sanidade Animal por ter aberto as portas do seu laboratório para realização dos testes microbiológicos. A sua aluna Luciana Mathias pela atenção, ajuda e por ter enriquecido este trabalho com numerosas contribuições e pelo auxílio durante a realização experimental.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
BHA	Ágar Brain heart Infusion
BHI	Caldo Brain heart Infusion
BuOH	Butanol
CC	Cromatografia em coluna aberta
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
COSY	Correlação homonuclear
D	Deutério
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
GEN	Gentamicina
HDA	Hidroalcoólico
Hex	Hexano
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
Hz	Hertz (ciclos por segundo)
ITRA	Itraconazol
J	Constante de acoplamento
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
OXA	Oxacilina
PA	Pureza analítica
ppm	Parte por milhão
Rf	Fator de retenção
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
SAB	Agar ou caldo Sabouraud dextrose
TBF	Terbinafina
TMS	Tetrametilsilano
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico (ressonância magnética nuclear)
β	Beta
α	Alfa
UFC	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cladograma da ordem Caryophyllales (SIMPSON, 1953).....	05
Figura 2 – Diversas substâncias presente na família Phytolaccaceae	17
Figura 3 – Folhas <i>Gallesia integrifolia</i> (Spreng) Harms (Fonte: acervo pessoal).....	23
Figura 4 – Substâncias isoladas de <i>G. integrifolia</i>	37
Figura 5 – Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de GFDCC-15.	42
Figura 6 – Expansão 1 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de GFDCC-15	43
Figura 7 – Expansão 2 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de GFDCC-15	44
Figura 8 – Expansão 3 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de GFDCC-15	45
Figura 9 – Espectro de RMN ^{13}C - APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de GFDCC-15.....	46
Figura 10 – Mapa de correlação ^1H - ^1H -COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de GFDCC-15.....	47
Figura 11 – Expansão 1 do mapa de correlação ^1H - ^1H -COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de GFDCC-15	48
Figura 12 – Mapa de correlação do espectro de HSQC (CDCl_3 , 500 MHz) de GFDCC-15.	49
Figura 13 – Mapa de correlação do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 MHz) de GFDCC-15 ..	50
Figura 14 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de GFH12.6.	54
Figura 15 – Espectro de HMBC (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de GFH12.6.	55
Figura 16 – Espectro de HMQC (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de GFH12.6.....	56
Figura 17 – Espectro de COSY (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de GFH12.6.	57
Figura 18 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de GFH 3.9.....	61
Figura 19 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (CDCl_3 , 400 MHz) de GFH 3.9.....	62
Figura 20 – Espectro de ^1H - ^1H - COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de GFH 3.9.	63
Figura 21 – Mapa de correlação do espectro de HSQC (CDCl_3 , 500 MHz) de GFH 3.9.....	64
Figura 22 – Mapa de correlação do espectro de HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) de GFH 3.9.	65
Figura 23 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de GFH 2.5.....	68
Figura 24 – Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) de GFH 2.5	69
Figura 25 – Espectro de ^1H - ^1H - COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de GFH 3.9	70

Figura 26 – Mapa de correlação do espectro de HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) de GFH 2.5.....	71
Figura 27 – Mapa de correlação do espectro de HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) de GFH 2.5.	72
Figura 28 – Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de GFD 4.1.....	75
Figura 29 – Espectro de RMN ¹³ C - DEPT (CDCl ₃ , 400 MHz) de GFD 4.1.....	76
Figura 30 – Mapa de correlação do espectro de HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) de GFD 4.1.....	77
Figura 31 – Halos formados pelos poços preenchidos com as frações diclorometânica (2) de <i>G. integrifolia</i> , solvente DMSO e os controles positivos (ITRA e TBF) frente a cepa clínica (A) e ATCC 10231 (B) de <i>C. albicans</i>	81
Figura 32 – Foto A demonstra que houve sinergismo da fração acetato de etila (3) com os controles positivos (ITRA e TBF) frente a cepa ATCC 10231 de <i>C. tropicalis</i> . Foto B demonstra que a mesma fração não inibiu o crescimento da levedura quando testado separadamente. As fotos C e D mostram o halo de inibição formado pela ação dos antifúngicos controle Terbinafina 1 mg /ml (TBF) e Itraconazol 1 mg/ml (ITRA), respectivamente.	81
Figura 33 – À esquerda demonstra que a fração hexânica (50 mg/ml) não inibiu <i>C. tropicalis</i> e à direita mostra a que a fração diclorometânica inibiu o crescimento da levedura.	83
Figura 34 – Em A, halos formados pelos poços preenchidos com a fração hexânica (1) e em B os halos formados pela fração diclorometânica (2) frente a cepa ATCC 28707 <i>C. tropicalis</i> a 28 °C.	84
Figura 35 – Halos formados pelos poços preenchidos com extrato metanólico bruto de <i>G. integrifolia</i> , solvente DMSO e os controles positivos (ITRA e TBF) frente a cepa ATCC 27807 <i>C. tropicalis</i> a 28 °C (A) e a 37 °C (B)..	84
Figura 36 – A fração hexânica (50 mg/ml) não inibiu <i>C. tropicalis</i> (A) e a fração diclorometânica inibiu o crescimento da levedura (B)	92
Figura 37 – Atividade antimicrobiana do extrato bruto de <i>G. integrifolia</i> frente à cepa COL: Controle (A); efeito bactericida na concentração 33 mg/ml (B) e crescimento bacteriano confluyente similar ao controle na concentração de 11mg/ml a 37 °C	96
Figura 38 – Atividade antifúngica do extrato bruto de <i>G. integrifolia</i> frente à cepa padrão <i>C. tropicalis</i> ATCC 28707 : Controle (A); efeito fungicida na concentração 33 mg/ml (B) e efeito fungistático na concentração de 11 mg/ml a 28 °C	97
Figura 39 – Atividade antifúngica do extrato bruto de <i>G. integrifolia</i> frente à cepa clínica de <i>C. albicans</i> : Controle (A); efeito fungistático na concentração 33 mg/ml (B) e confluência de colônias na concentração de 11 mg/ml a 28 °C	97
Figura 40 – Atividade antifúngica do extrato bruto de <i>G. integrifolia</i> frente à cepa padrão de <i>C. tropicalis</i> : Controle (A); efeito fungicida na concentração 33 mg/ml (B) e na concentração de 11 mg/ml (C) e efeito fungistático na concentração de 3,7 mg/ml (D) a 37 °C	98

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Fluxograma dos procedimentos realizados com o extrato das folhas de <i>Gallesia integrifolia</i>	27
Esquema 2 – Técnica de difusão em poços para avaliação de atividade antimicrobiana (GELINSKI <i>et al.</i> , 2007)	34

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1 – Média do crescimento bacteriano das frações de <i>G. integrifolia</i> frente <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	87
Gráfico 2 – Média do crescimento bacteriano das frações de <i>G. integrifolia</i> frente a cepa <i>S. aureus</i> clínica	87
Gráfico 3 – Média do crescimento bacteriano das frações de <i>G. integrifolia</i> frente a cepa <i>S. aureus</i> LSA 88.....	88
Gráfico 4 – Média do crescimento fúngico das frações de <i>G. integrifolia</i> frente a cepa <i>S. aureus</i> COL.....	88
Gráfico 5 – Percentual de inibição do crescimento das partições (1, 2, 3 e 4) do extrato metanólico de <i>G. integrifolia</i> , dos controles positivos Gentamicina e Oxacilina e do solvente DMSO frente as quatro cepas de <i>S. aureus</i>	89
Gráfico 6 – Média do crescimento fúngico das frações acetato de etila e n-butanólica de <i>G. integrifolia</i> frente a cepa <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	90
Gráfico 7 – Média do crescimento fúngico das frações acetato de etila e n-butanólica de <i>G. integrifolia</i> frente a cepa <i>C. albicans</i> clínica.....	90
Gráfico 8 – Percentual de inibição do crescimento da fração acetato de etila (3) e n-butanol (4), dos controles positivos Miconazol, Itraconazol e Terbinafina e do solvente DMSO frente a <i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	91
Gráfico 9 – Média do crescimento fúngico das frações de <i>G. integrifolia</i> frente a linhagem <i>C. tropicallis</i> ATCC 28707	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de gêneros e espécies e distribuição geográfica das famílias da ordem Caryophyllales (subclasse Caryophyllidae) (BARROSO <i>et al.</i> , 2002) durante o mestrado....	06
Tabela 2 – Os gêneros e suas respectivas espécies da família Phytolaccaceae no Brasil ..	08
Tabela 3 – Subfamílias e seus respectivos gêneros da família Phytolaccaceae	10
Tabela 4 – Substâncias encontradas no gênero <i>Anisomeria</i>	12
Tabela 5 – Substâncias encontradas no gênero <i>Phytolacca</i>	13
Tabela 6 – Substâncias encontradas no gênero <i>Agdestis</i>	14
Tabela 7 – Substâncias encontradas no gênero <i>Petiveria</i>	15
Tabela 8 – Substâncias encontradas no gênero <i>Gallesia</i>	16
Tabela 9 – Análise cromatográfica do extrato hexânico de <i>G. integrifolia</i>	29
Tabela 10 – Sistemas de solvente testados na partição diclorometânica do extrato metanólico de <i>G. integrifolia</i>	31
Tabela 11 – Microorganismos utilizados nas análises antimicrobianas	32
Tabela 12 – Os Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) da porfirina GFDC 15 , em CDCl ₃ , as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC e comparação com valores de referência do modelo Mo-1 (17 ³ -etoxifeoforbídeo) (SIANNE <i>et al.</i> , 1998).....	41
Tabela 13 – Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) da porfirina GFH 12-6 , em CDCl ₃ , as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC e comparação com valores de referência do modelo Mo-2 (éster etílico do 10-hidrofeoforbídeo A) (MATSUO <i>et al.</i> , 1996; CHEE <i>et al.</i> , 2005)	53
Tabela 14 – Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e DEPTQ (400 MHz) do diterpeno GFH 3.9 , em CDCl ₃ , as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC, além da comparação com os valores das substâncias referências (NAGASHIMA <i>et al.</i> , 1995; COSTA; FUJIWARA; IMAMURA, 1998).....	60
Tabela 15 – Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C (100 MHz) do poliprenóide GFH 2.5 e 2.4 , em CDCl ₃ , as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC e comparação com valores de referência do modelo Mo-5 (FEITOSA; BEZERRA, 2007)	67
Tabela 16 – Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C (100 MHz) da lignana GFD 4.1 , em CDCl ₃ , as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC e comparação com valores de referência do modelo Mo-6 e 7 (MAHATO; KUNDU, 1994).	74

Tabela 17 – Tabela 18: Média dos halos de inibição (mm de diâmetro) em teste de difusão em Agar a 37°C	79
Tabela 18 – Média dos halos de inibição (mm de diâmetro) em teste de difusão em Agar a 37°C	82
Tabela 19 – Antibiograma (medido em milímetros) de cepas de <i>S. aureus</i> tratadas com extratos e submetidos a 6 antibióticos pelo método de difusão em ágar.....	86
Tabela 20 – Antibiograma (medido em milímetros) de cepas de <i>S. aureus</i> tratadas com extratos e submetidos a 6 antibióticos pelo método de difusão em ágar.....	93
Tabela 21 – Antibiograma (medido em milímetros) de cepas de <i>S. aureus</i> tratadas com extratos e submetidos a 6 antibióticos pelo método de difusão em ágar.....	93
Tabela 22 – Antibiograma (medido em milímetros) de cepas de <i>S. aureus</i> tratadas com extratos e submetidos a 6 antibióticos pelo método de difusão em ágar.....	94
Tabela 23 – Antibiograma (medido em milímetros) de cepas de <i>S. aureus</i> tratadas com extratos e submetidos a 6 antibióticos pelo método de difusão em ágar.....	94

RESUMO

NEVES, Fernanda da Silva. **Estudo químico e microbiológico de *Gallesia integrifolia* (Spreng) Harms. (Phytolaccaceae)** 2012. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos do Goytacazes, 2012.

A espécie *Gallesia integrifolia*, pertencente à família Phytolaccaceae e subfamília Rivinoideae, é conhecida popularmente por pau d'alho devido ao forte odor característico exalado. Há relatos da utilização dessa planta, na medicina popular, para o tratamento externo de otite, contra verminoses, gonorréia, combate a tumores de próstata, como hipotensora e hipolipemiante, além de ser considerada abortiva. Os poucos estudos realizados com essa espécie, revelaram somente a presença de substâncias contendo enxofre. No entanto, foram isolados flavonóides e terpenos em espécies vegetais da mesma subfamília. Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho foi identificar os constituintes químicos mais abundantes da *G. integrifolia* e avaliar a atividade antimicrobiana dos seus extratos frente 4 linhagens de *S. aureus*, 2 linhagens de *C. albicans* e uma de *C. tropicalis*. As frações foram submetidas a uma análise preliminar, para determinação prévia dos melhores sistemas de eluição e reveladores, e em seguida, às diversas técnicas cromatográficas, como Cromatografia em Camada Delgada, Cromatografia em Coluna Aberta e Cromatografia Contracorrente para purificação das substâncias e métodos espectroscópicos, como Ressonância Magnética de Hidrogênio e Carbono para identificação de seus componentes. Do extrato metanólico de *Gallesia integrifolia* foram isoladas 6 substâncias: 2 porfirinas: 7c-metoxifeoforbídeo a e 7c-metoxi-10-hidroxifeoforbídeo a; 3 triterpenos: sendo uma mistura binária, α -amirina e β -amirina; Hexaprenol e 1 diterpeno: 15-hidroxi-13-clerodeno, sendo este inédito na literatura. Todas as espécies isoladas são descritas pela primeira vez no vegetal estudado. O extrato metanólico bruto e suas partições mostraram o potencial antimicrobiano frente aos fungos *C. albicans* e *C. tropicalis*, e ainda sobre uma cepa de *S. aureus*.

Palavras-chave: terpenóides, porfirinas, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*

ABSTRACT

The species *Gallesia integrifolia*, belonging to the family and subfamily Phytolaccaceae Rivinoideae, is popularly known as pau d'garlic due to the strong characteristic odor exhaled. There are reports of the use of this plant in folk medicine for the treatment of external otitis against worms, gonorrhea, fights prostate tumors, such as antihypertensive and lipid-lowering, and is considered abortive. The few studies of this kind, revealed only the presence of sulfur-containing substances. However, were isolated flavonoids and terpenes in plant species of the same subfamily. Thus, the main objective of this study was to identify the most abundant chemical constituents of *G. integrifolia* and evaluate the antimicrobial activity of their extracts against four strains of *S. aureus*, two strains of *C. albicans* and *C. tropicalis*. The fractions were subjected to a preliminary analysis, prior to determining the best systems of elution and revealing, and then the various chromatographic techniques such as Thin Layer Chromatography, Column Chromatography in Open and Countercurrent Chromatography for purification of substances and spectroscopic methods, and Magnetic Resonance of Hydrogen and Carbon to identify its components. The methanol extracts of *Gallesia integrifolia* six substances were isolated: two porphyrins: 7c-metoxypheophorbide a e 7c-methoxy-10-hidroxipheophorbide a; 3 triterpenes: being a binary mixture, α -amyrin and β -amyrin; Hexaprenol and 1 diterperno: 15 - clerodeno-hydroxy-13, this being unheard in the literature. All isolated species are described for the first time in the plant studied. The crude methanol extract showed the partitions and their antimicrobial potential against fungi *C. albicans* and *C. tropicalis*, and on a strain of *S. aureus*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	OBJETIVOS.....	02
1.1.1	Objetivo geral	02
1.1.2	Objetivos específicos	03
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1	ORDEM CARYOPHYLLALES.....	04
2.3	FAMÍLIA PHYTOLACCACEAE	07
2.3.1	ASPECTOS BOTÂNICOS	11
2.3.2	PERFIL QUÍMICO DA FAMÍLIA	12
2.3.2.1	Constituintes químicos isolados da subfamília Phytolacchoideae	12
2.3.2.2	Constituintes químicos isolados da subfamília Agdestidoideae	14
2.3.2.3	Constituintes químicos isolados da subfamília Rivinoideae	14
2.3.3	A espécie <i>Gallesia integrifolia</i> (Spreng) Harms	23
3	METODOLOGIA	25
3.3	ESCOLHA DA PLANTA ESTUDADA.....	25
3.4	COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL.....	26
3.5	PERFIL CROMATOGRÁFICO, SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO.....	28
3.6	IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS PUROS.....	28
3.7	DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL DO ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA <i>GALLESIA INTEGRIFOLIA</i>	29
3.7.1	Fração hexânica	29
3.7.2	Fração diclorometânica.....	30
3.8	Ensaio microbiológicos com as partições do extrato metanólico	32
3.8.1	Ensaio de inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>Candida</i> pelo teste de difusão em ágar.....	33
3.8.2	Ensaio de inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>Candida</i> pelo teste em meio de cultura líquido	34
3.8.3	Atividade de antibióticos após tratamento com os extratos de <i>G. integrifolia</i>	35
3.8.4	Avaliação da bioatividade do extrato bruto de <i>G. integrifolia</i> pelo teste de diluição em série.....	35
4.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	Substâncias isoladas do extrato metanólico bruto das folhas de <i>Gallesia integrifolia</i>	37
4.1.1	Caracterização da substância GFDCC 15	38
4.1.2	Caracterização da substância GFH 12.6.....	51
4.1.3	Caracterização da substância GFH 3.9	58
4.1.4	Caracterização da substância GFH 2.5.....	66
4.1.5	Caracterização da substância GFD 4.1	73

4.2	ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS DO EXTRATO BRUTO E DAS PARTIÇÕES DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DE <i>GALLESIA INTEGRIFOLIA</i>	78
4.2.1	Avaliação pelo método Difusão em Agar	78
4.2.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	78
4.2.1.2	<i>Candida albicans</i>	80
4.2.2	Avaliação pelo método em meio líquido	87
4.2.2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	87
4.2.2.2	<i>Candida albicans</i> e <i>C. tropicallis</i>	89
4.2.3	Antibiograma das cepas de <i>S. aureus</i> após tratamento com as frações de <i>G. integrifolia</i>	92
4.2.4	Método da diluição seriada em meio de cultura líquida para <i>S. aureus</i>	96
4.2.5	Método da diluição seriada em meio líquido para <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicallis</i>	96
5	CONCLUSÃO	98
	REFERÊNCIAS.....	100

1. INTRODUÇÃO

As plantas têm sido tradicionalmente utilizadas pelas populações de todos os continentes no controle de diversas doenças e pragas, além de representar uma fonte importante de substâncias biologicamente ativas, que são utilizadas como medicamentos ou como modelo para síntese de um grande número de fármacos (LUPE, 2007).

O Brasil é o país com maior potencial para pesquisa com espécies vegetais, por deter a maior e a mais rica parcela da biodiversidade do planeta, em torno de 15 a 20% do total mundial conhecido (BUFFON, 2005). Estima-se que o nosso país possua 50.000 espécies de plantas superiores, produtoras de madeiras, celulose, fibras, alimentos, óleos vegetais e óleos essenciais entre outros produtos naturais. No entanto, apenas 8 % das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e apenas 1.100 espécies vegetais desta flora foram avaliadas em suas propriedades medicinais (SIMÕES *et al.*, 2004).

O Brasil além de ser muito rico em recurso biológico apresenta também uma grande diversidade cultural, bem como uma extensa área territorial, que dificulta o acesso da população aos serviços prestados pela rede pública de saúde. Logo, todos esses fatores acabam contribuindo para o fortalecimento da medicina tradicional local, e faz do nosso país um território propício para o desenvolvimento de estudos etnofarmacológicos e ainda pode resultar no descobrimento de diferentes substâncias bioativas, aumentando as possibilidades de uma nova descoberta terapêutica (RODRIGUES, 2011).

Foi pensando nisso, que o governo federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, através do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, visando que seja garantido à população brasileira acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e, além disso, promover o uso sustentável da nossa biodiversidade. O Ministério criou ainda uma Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), com cerca de 70 espécies. Esta listagem considera as espécies vegetais que já estão sendo utilizadas nos serviços de saúde estaduais e municipais, o conhecimento tradicional e popular e os estudos químicos e farmacológicos disponíveis.

Neste contexto, a etnofarmacologia, ou seja, o conhecimento popular do uso terapêutico de plantas oferece informações de suma importância para o estudo fitoquímico de espécies ainda pouco conhecida ou totalmente desconhecidas cientificamente. Shiva (2001) confirma esse fato, pois relata que 75% das propriedades dos 120 princípios ativos isolados de plantas superiores e amplamente utilizados na medicina moderna foram identificados pela medicina tradicional.

Assim, intensificação dos trabalhos etnobotânicos leva ao conhecimento das espécies que são utilizadas, podendo servir como instrumento de estratégias de utilização e conservação das espécies medicinais e seus potenciais, além de preservação do saber local e do emprego de produtos naturais na atenção primária à saúde, já que o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos.

Nesse sentido, dentre as muitas espécies da flora brasileira com potencial terapêutico, encontra-se *Gallesia integrifolia* (Spreng) Harms (figura 3, pág. 23), uma espécie conhecida popularmente por Pau d'alho, Gorarema, Guararema, Ibararema e Ubirarema. Poucos estudos foram realizados com essa espécie. Porém, há cada vez mais um grande interesse nessa espécie, especialmente pelos relatos da população da ação antimicrobiana e anti-inflamatória. Já que a busca por novos agentes antimicrobianos provenientes de vegetais tornou-se de suma importância, uma vez que existem microorganismos resistentes e em constantes mutações.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- ✚ Identificar os constituintes químicos mais abundantes e verificar a atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *Gallesia integrifolia* (Sprengel) Harms (Phytolaccaceae).

1.1.2 Objetivos específicos

- ✚ Isolar, purificar e identificar os constituintes químicos do extrato metanólico das folhas da *Gallesia integrifolia*;
- ✚ Realizar testes microbiológicos para avaliar as propriedades antibacteriana e antifúngica dos extratos e frações de *Gallesia integrifolia*;
- ✚ Contribuir com a química de produtos naturais com relação ao seu perfil químico e produção de metabólitos secundários da família Phytolaccaceae.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ORDEM CARYOPHYLLALES

A ordem Caryophyllales conhecida anteriormente por Centrospermae, pertence à subclasse Caryophyllidae. Segundo Barroso e colaboradores (2002) que adota a classificação de Cronquist (1968), esta ordem contém 11 famílias, distribuídas no Brasil e no mundo (Tabela 1, pág. 6). Contudo, segundo o sistema de classificação APG II (2003), a ordem Caryophyllales apresenta 28 famílias, dividido em dois grupos: Caryophyllales Nuclear, com cerca de 15 famílias e Caryophyllales Superiores, com cerca de 10 famílias (figura 1, pág. 5). Os componentes deste último são caracterizados pela presença de betalaínas, pigmento nitrogenado avermelhado (betacianinas) ou amarelado (betaxantinas) que substitui as antocianinas encontradas nas demais angiospermas (KHAN, 2011; CUENOUD *et al.*, 2002).

Segundo Schäferhoff, Müller e Borsch (2009), Caryophyllales possui aproximadamente 12.000 espécies, sendo considerada uma das maiores ordens das eudicotiledôneas. Muitas espécies pertencentes a esta ordem são adaptadas a ambientes secos ou áridos e são plantas importantes, tanto economicamente (tal como espinafre, quinoa) como decorativas (tal como cactos e craveiros).

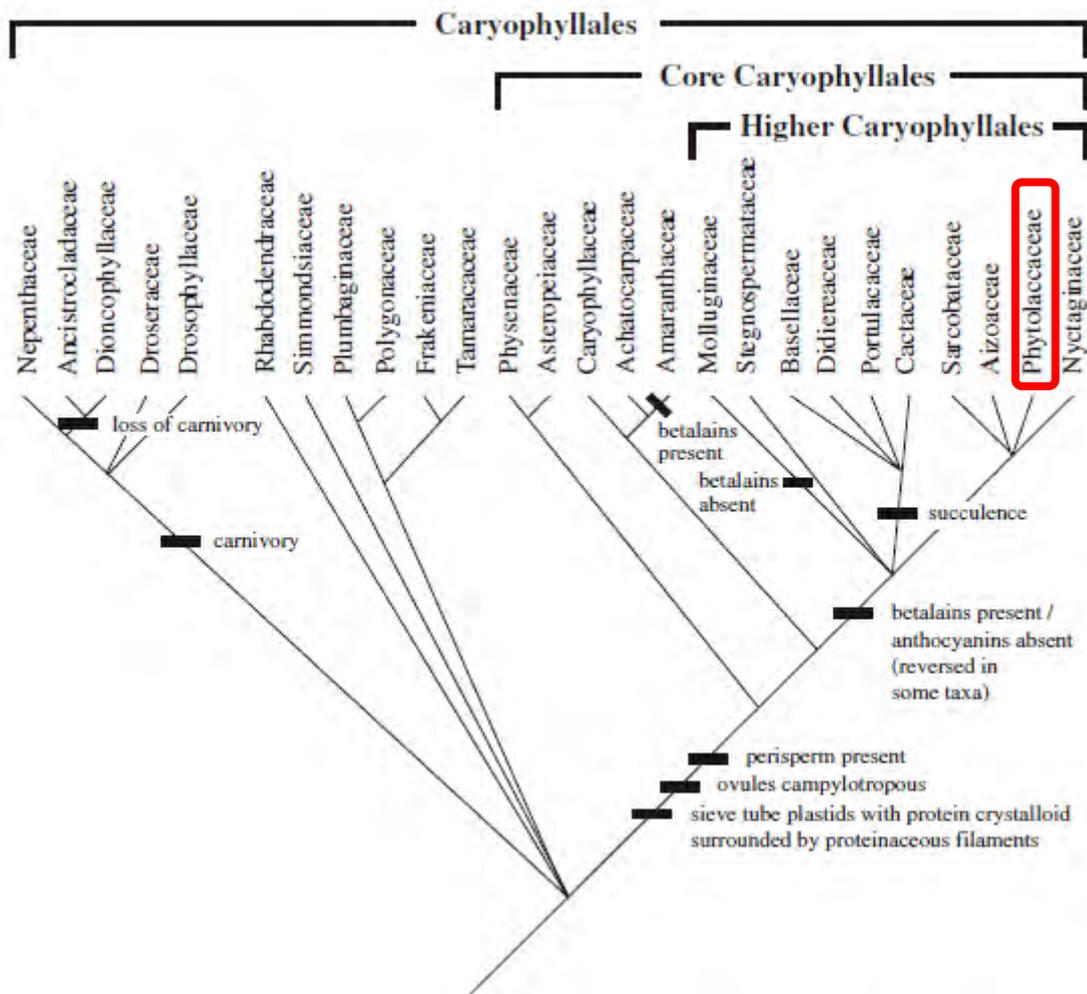


Figura 1: Cladograma da ordem Caryophyllales (SIMPSON, 1953).

A tabela 1 mostra que a família Chenopodiaceae contribui com o maior número de gêneros, enquanto que a Aizoaceae contribui com o maior número de espécies. Entretanto, dentre as diversas famílias desta ordem, as que possuem grande ocorrência no Brasil são: Caryophyllaceae, Phytolaccaceae, Amaranthaceae, Portulacaceae, Cactaceae e Nyctaginaceae (JUDD *et al.*, 2008 *apud* GODOFREDO, 2009).

Tabela 1: Número de gêneros e espécies e distribuição geográfica das famílias da ordem Caryophyllales (subclasse Caryophyllidae) (BARROSO *et al.*, 2002)

FAMÍLIA	Nº TOTAL		INDÍGENAS E SUBESPONTÂNEAS		CULTIVADAS	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	
	Gênero	Espécie	Gênero	Espécie		Gênero	No mundo
Phytolaccaceae	17	120	8	27		Dos trópicos e subtrópicos, especialmente da América do Sul	Em todo o País, especialmente Sul e Sudeste
Achatocarpaceae	2	16	1	1		América Central e do Sul	
Nyctaginaceae	30	300	10	70		Trópicos, principalmente da América	Em todo o País
Chenopodiaceae	120	1.300	6	18		Largamente difundidas nas regiões litorâneas	Subespontâneas em todo litoral brasileiro
Amaranthaceae	65	1.000	15	100		Trópicos, subtrópicos e regiões temperadas da América e da África	Em todo País
Molluginaceae	9	90	2	3		Trópicos e subtrópicos de ambos os hemisférios	Em todo País
Aizoaceae	115	2.410	1	2	2	Na África do Sul e Austrália, em regiões áridas	Paraíba, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul
Basellaceae	5	20	2	4		América Tropical, Ásia e África	Subespontâneas em quase todo o País
Portulacaceae	19	500	2	33		África e Novo Mundo	Em todo o País
Caryophyllaceae	80	2.000	15			Amplamente distribuídas em todas as regiões do mundo	Subespontâneas ou cultivadas em todo o País
Cactaceae	84	2.000	32	160	8	América, África, Madagascar e Ceilão	Em todos os Estados
Nº total no Brasil:			94	418	10		

2.3 FAMÍLIA PHYTOLACCACEAE

A família Phytolaccaceae, da ordem Caryophyllales, foi morfológicamente descrito primeiramente por Heimerl (1889, 1934) e Walter (1909), de acordo com Cevallo-Ferriz (2008). Todavia, a descrição da família Phytolaccaceae não está bem definida, sendo o número de gêneros e espécies variável conforme os diferentes sistemas de classificação (Cronquist, 1968; Nowicke, 1968; APG III, 2009), já que esta é notoriamente uma família difícil de delimitar, consistindo, em parte, de diversos gêneros pequenos e monotípicos (NOWICKE, 1968).

Conforme Barroso e colaboradores (2002), o sistema de classificação de Cronquist (1968), considerou a família com cerca de 17 gêneros e 120 espécies pantropicais, pertencentes principalmente a América do Sul, sendo que no Brasil, constam 8 gêneros e cerca de 27 espécies, distribuídas especialmente nas Regiões Sul e Sudeste. Esse sistema retirou o gênero *Microtea* desta família (Barroso *et al.*, 2002).

Nowicke (1968) descreveu a família contendo 17 gêneros (*Anisomeria*, *Ercilla*, *Phytolacca*, *Gallesia*, *Seguieria*, *Rivinia*, *Trichostigma*, *Schindleria*, *Hillieria*, *Petiveria*, *Ledenbergia*, *Monococcus*, *Agdestis*, *Microtea*, *Lophiocarpus*, *Stegnosperma* e *Barbeuia*), organizados em seis subfamílias (Phytolaccoideae, Rivinoideae, Agdestioideae, Microteoideae, Stegnospermoideae e Barbeuioideae).

Segundo Forzza (2010), 8 gêneros e 22 espécies desta família podem ser encontrados distribuídos em todo Brasil, sendo a maioria destas, de grande ocorrência nos mais variados domínios fitogeográficos do país, como mostra a tabela 2, página 8.

Tabela 2: Os gêneros e suas respectivas espécies da família Phytolaccaceae no Brasil (FORZZA, 2010).

ESPÉCIE	ORIGEM/ENDEMISMO	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	DOMÍNIOS FITOGEOGRÁFICOS
<i>Gallesia</i> Casar.			
<i>Gallesia integrifolia</i> (Spreng.) Harms	nativa; endêmica	Norte (AM, AC), Nordeste (CE, PB, PE, BA), Centro-Oeste (MT), Sudeste (MG, SP, RJ), Sul (PR)	Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica
<i>Hilleria</i> Vell.			
<i>Hilleria latifolia</i> (Lam.) H. Walter	nativa; não endêmica	Norte (PA, AC), Nordeste (CE, BA), Centro-Oeste (DF), Sudeste (ES, RJ)	Amazônia, Mata Atlântica
<i>Microtea</i> Sw.			
<i>Microtea bahiensis</i> Marchior. & J.C.Siqueira	nativa; endêmica	Nordeste (BA)	Caatinga
<i>Microtea debilis</i> Sw.	nativa; não endêmica	Norte (AP, PA, AM, AC), Nordeste (BA)	Amazônia
<i>Microtea glochidiata</i> Moq.		Norte (PA), Nordeste (MA, CE, PE, BA), Sudeste (MG, RJ)	Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica
<i>Microtea longibracteata</i> H. Walter	nativa; endêmica	Nordeste (CE, PB, PE, BA), Sudeste (ES)	Caatinga
<i>Microtea maypurensis</i> (Kunth) G.Don	nativa; não endêmica	Norte (RR, PA, AM), Nordeste (RN, PB, PE, BA, SE), Sudeste (ES, RJ)	Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica
<i>Microtea paniculata</i> Moq.	nativa; não endêmica	Nordeste (MA, CE, PB, PE, BA), Centro-Oeste (MT, GO, DF, MS), Sudeste (MG, ES, RJ)	Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal
<i>Microtea papilosa</i> Marchior. & J.C.Siqueira	nativa; endêmica	Nordeste (BA)	Cerrado
<i>Microtea scabrida</i> Urb.	nativa; não endêmica	Norte (AM), Nordeste (PB, BA), Sudeste (MG, SP, RJ), Sul (PR, SC, RS)	Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa
<i>Microtea tenuifolia</i> Moq.	nativa; endêmica	Nordeste, Sudeste (MG)	Caatinga, Cerrado
<i>Petiveria</i> L.			

<i>Petiveria alliacea</i> L.	subespontânea; não endêmica	Norte (AC), Sul (PR, SC, RS)	Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa
<i>Phytolacca</i> L.			
<i>Phytolacca dioica</i> L.	nativa; não endêmica	Nordeste, Centro-Oeste (MT, MS), Sudeste (MG, SP, RJ), Sul (PR, SC, RS)	Mata Atlântica
<i>Phytolacca rivinoides</i> Kunth & Bouché	nativa; não endêmica	Norte (RR, PA, AM, AC, RO), Nordeste (MA, BA), Centro-Oeste (MT)	Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal
<i>Phytolacca thyrsoiflora</i> Fenzl. ex J.A.Schmidt	nativa; não endêmica	Norte (RR, PA), Nordeste (MA, CE, PB, PE, BA, AL), Centro-Oeste (GO, DF, MS), Sudeste (MG, ES, SP, RJ), Sul (PR, SC, RS)	Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa
<i>Rivina</i> L.			
<i>Rivina humilis</i> L.	subespontânea; não endêmica	Norte (AM), Nordeste (CE, BA), Centro-Oeste (MT), Sudeste (MG, ES, SP, RJ), Sul (RS)	Amazônia, Caatinga, Pampa
<i>Seguiera</i> Loefl.			
<i>Seguiera aculeata</i> Jacq.	nativa; não endêmica	Norte (RR, AM, RO), Nordeste (BA), Sudeste (MG, ES, SP, RJ), Sul (PR, SC, RS)	Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa
<i>Seguiera americana</i> L.	nativa; não endêmica	Nordeste (CE, BA), Sudeste (MG, SP, RJ)	Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica
<i>Seguiera langsdorffii</i> Moq.	nativa; endêmica	Nordeste (BA), Sudeste (MG, ES, SP, RJ), Sul (PR, SC, RS)	Cerrado, Mata Atlântica
<i>Seguiera macrophylla</i> Benth.	nativa; não endêmica	Norte (RR, PA, AM, AC, RO), Nordeste (MA)	Amazônia
<i>Seguiera paraguayensis</i> Morong	nativa; não endêmica	Centro-Oeste (MS)	Cerrado
<i>Trichostigma</i> A.Rich.			
<i>Trichostigma octandrum</i> (L.) H.Walter	nativa; endêmica	Norte (AM, AC), Nordeste (BA), Sul (PR, SC)	Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica

No presente trabalho, segue-se a sistemática proposta de acordo com a classificação mais atual, o APG III (“Angiosperm Phylogeny Group”). Este sistema de classificação considera Phytolaccaceae (incluindo Petiveriaceae e excluindo *Microtea*, que foi transferida para Amaranthaceae) distribuída em três subfamílias: Phytolacchoideae, Rivinoideae e Agdestidoideae, como apresentado na tabela 3, logo abaixo.

Tabela 3: Subfamílias e seus respectivos gêneros da família Phytolaccaceae.

SUBFAMÍLIA	GENERO
PHYTOLACCOIDEAE Arn. (Sinónimo: Sarcocaceae)	<i>Anisomeria</i> Don. <i>Ercilla</i> Juus. <i>Phytolacca</i> L. <i>Nowickea</i> J. Martínez & J. A. Adanson
RIVINOIDEAE Nowicke (Sinónimo: Hilleriaceae, Petiveriaceae, Riviniaceae, Seguieriaceae)	<i>Gallesia</i> Casar. <i>Hillera</i> Vell. <i>Ledenbergia</i> Klotzsch ex Moq. <i>Monococcus</i> F. Muell. <i>Petiveria</i> L. <i>Rivina</i> L. <i>Schindleria</i> H. Walter <i>Seguieria</i> Loefl. <i>Trichostigma</i> A. Richard
AGDESTIDOIDEAE Nowicke (Sinónimo: Agdestidaceae)	<i>Agdestis</i> Moc. & Sessé ex DC.

2.3.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

A Phytolaccaceae é representada por ervas, arbustos, subarbustos, e até mesmo árvores de grande porte, como *Phytolacca dióica* e *Seguiera* spp., e trepadeiras, como espécies de *Agdestis clematidea* Moc & Sessé ex DC.

Conforme Barroso e colaboradores (2002), as folhas desta família são, geralmente, alternas, sem estípulas e com presença de rafídios nas células. Possui flores andróginas ou unissexuadas, monoclamídeas, com 4-5 sépalas membranáceas, dispostas em racemos ou em espigas. Pode possuir androceu polistêmone, com muitos estames em disposição centrífuga, frutos persistentes, como é o caso da *Seguiera* e *Gallesia*, ou isostêmone, formado de 4-5 estames; filetes filiformes e anteras mais ou menos globosas.

Com relação ao fruto, estes podem ser aquênios, como em *Seguiera* e *Gallesia*, ou bagas sucosas, disseminadas por animais, como em *Rivina* e *Phytolacca*.

As sementes possuem perisperma farinoso, branco, contornado por embrião curvo, cilíndrico, periférico, com cotilédones planos ou dobrados, ou com endosperma parco, em *Petiveria*, e embrião reto, com cotilédones foliáceos, desiguais entre si, mais ou menos semelhantes a algumas espécies da família Nyctaginaceae.

2.3.2 PERFIL QUIMICO DA FAMILIA

2.3.2.1 Constituintes químicos isolados da subfamília Phytolacchoideae

O estudo fitoquímico das plantas da família Phytolaccaceae revelam a presença de metabólitos secundários oriundos da rota dos terpenos (tabelas 4-8, pag. 12 - 16 e figura 2, pag. 17)

Gênero Anisomeria Don.

Os poucos estudos a respeito desse gênero revelam a presença de saponinas triterpênicas.

Tabela 4: Substâncias encontradas no gênero *Anisomeria*.

ESPECIE	PARTE DA PLANTA	SUSBTÂNCIA	REFERÊNCIA
<i>Anisomeria coriacea</i>	raiz	phytolaccagenina (1); ácido phytolaccagênico (2)	APPEL, 1987
<i>Anisomeria chilensis</i>	folha	trifenilmetano (3); difenilmetano (4)	APPEL; CHAMY, 1979

Gênero Phytolacca L.

Este é o maior gênero da família Phytolaccaceae e o que apresenta mais estudos relacionados à sua composição química e propriedades biológicas. Além disso, o gênero é rico em saponinas triterpênicas que apresentam relevantes atividades farmacológicas, como antifúngica, anti-inflamatória e moluscida (ESCALANTE, 2002). Essas espécies despertaram o interesse, principalmente, para a investigação do gênero *Phytolacca* visando o controle e o combate da esquistossomose e seus veículos transmissores (BRAZ- FILHO, 2010).

Tabela 5: Substâncias encontradas no gênero *Phytolacca*.

ESPECIE	PARTE DA PLANTA	SUSBTÂNCIA	REFERÊNCIA
<i>Phytolacca americana</i>	baga	prolina-Bx (5); 17-decarboxi-betanina (6); tirosina-Bx (7); betanidina (8); 2-decarboxi-betanina (9); neobetanina (10); isoleucina-Bx (11); leucina-Bx (12); fenilalanina-Bx (13); betanina (14); 2'-apiosilbetanina (15); gomphrenina (16); 6'-o-salicilbetanina (17); 5''-o-salicil-2'-o-apiosilbetanina (18), 2'-o-glucosil-6'-o-salicilbetanina (19); 5''-o-E-feruloil-2'-apiosilbetanina (20); 5''-o-E-sinapoil-2'-apiosilbetanina (21)	JERZ <i>et al.</i> , 2008;
	raíz	oftasceina (26); phytolaccasaponina 2 (28); phytolaccasaponina 3 (29); phytolaccasaponina 4 (30); phytolaccasaponina 5 (31); esculentosideo M (33); esculentosideo S (34); esculentosideo R (35); α -espinasterol (38)	WANG, 2008; JEONG, 2004
	semente	ácido dicarboxílico (43); americanina A (60)	TAKAHASI, 2003; HASEGAWA, 1987
<i>Phytolacca acinosa</i>	raíz	esculentosideo B (22); esculentosideo A (23); esculentosideo C (24); esculentosideo H (25); Phytolaccosideo F (36); 32; 1; 2	HE <i>et al.</i> , 2011; STRAUSS, 1995
	folha	acinospesigenina (51)	SPENGEL, 1990
<i>Phytolacca esculenta</i>	raíz	32; esculentosideo K (52)	YI, 1992; YI; DAÍ, 1991
	semente	ácido acetilaleuritólico (62)	WOO;KANG, 1985
<i>Phytolacca polyandra</i>	raíz	α -espinasterol-D-glucosídeo (39); ciclo (alanina-leucina) (40); ciclo (alanina-isoleucina) (41); maculosina (42)	XIONG, 2002
<i>Phytolacca dodecandra</i>	baga	ácido oleanólico (55); ácido 2-hidróxioleanólico (56); hedereogenina (57); baiogenina (58)	PARKHURST <i>et al.</i> , 1990

Gêneros *Ercilla* Juus. e *Nowickeia* J. Martínez & J. A. Adanson

Não foram encontrados relatos na literatura sobre estudos químicos e/ou farmacológicos destes gêneros.

2.3.2.2 Constituintes químicos isolados da subfamília Agdestidoideae

Agdestis Moc. & Sessé ex DC.

O trabalho de Pino e Abreu (2007), revelou a presença de diversas substâncias terpênicas nesse gênero.

Tabela 6: Substâncias encontradas no gênero *Agdestis*.

ESPECIE	PARTE DA PLANTA	SUSBTÂNCIA	REFERÊNCIA
<i>Agdestis clematidea</i>	raiz	Isoforona (63); α -Pinene (64); β -Cariofileno (65); Piperitona (66); Salicilaldeido (67); Safrol (68); o-Xileno (69); Eugenol (70); Furfural (71); acetato de Geranila (72); acetate de Isobornila (73); Limoneno (74); Geranial (75); β -Bisaboleno (76); Dimetil dissulfito (77); Dimetil trissulfito (78); Geranil acetona (79)	PINO; ABREU, 2007

2.3.2.3 Constituintes químicos isolados da subfamília Rivinoideae

Gênero *Hillieria* Vell.

Não foi encontrado estudo químico referente ao gênero.

Gênero *Ledenbergia* Klotzsch ex Moq.

Estudo realizado por Jadot, Casimir e Loffet, em 1967, revelou a presença do ácido **2(S),4(R)-gama – hidróxi-gama-metilglutâmico (59)** na espécie *Ledenbergia roseo-aenea*.

Gênero *Petiveria* L.

Diversos estudos mostraram que as principais substâncias bioativas presente em certas espécies deste gênero como os polissulfitos, derivados sulfóxido de cisteína e sulfonas. Além de flavanonas e flavonóis.

Tabela 7: Substâncias encontradas no gênero *Petiveria*.

ESPECIE	PARTE DA PLANTA	SUSBTÂNCIA	REFERÊNCIA
Petiveria alliaceae	raiz	dissulfito de dipropila (27); sulfeto de dibenzila (44); dissulfeto de dibenzila (46); trissulfito de dibenzila (47); tetrassulfito de dibenzila (48); hidroximetilsulfito de benzila (49); Di (benziltrítio) metano (50)	BENEVIDES <i>et al.</i> , 2001; BLAINSKI <i>et al.</i> , 2010).
	folha	6-formil-8-metil-7-O-metilpinocembrina (116); 6-hidroximetil-8-metil-7-O-metilpinocembrina (117); 6-hidroximetil-5,7-di-O-metilpinocembrina (118); 3-O-ramnosideo do dihidrocampferol (119); dihidroquercetina (120); mircetina (121)	DELLE MONACHE; SUAREZ, 1992

Gênero *Rivina* L.

Foram encontrados apenas dois estudos da composição química deste gênero, que mostram a presença de substâncias da classe das betaínas, a betaxantina **humilixantina (53)** e o **3'-sulfato de betanina (54)** (IMPERATO, 1975; STRACK *et al.*, 1987).

Gêneros *Schindleria* H., *Monococcus* F. Muell, *Seguieria* Loefl e *Trichostigma* A. Richard

Não há relatos na literatura sobre estudos químicos e/ou farmacológicos sobre estes gêneros.

Gênero *Gallesia* Casar.

Na análise dos constituintes químicos do óleo essencial da casca de *Gallesia gorazema*, foram identificados substâncias não-sulfonadas, como alcoóis ramificados, fenóis e cetonas aromáticas e substâncias sulfonadas, tais como polissulfitos, sulfóxidos e sulfonas.

Tabela 8: Substâncias encontradas no gênero *Gallesia*.

ESPECIE	PARTE DA PLANTA	SUSBTÂNCIA	REFERÊNCIA
<i>Gallesia gorazema</i>	casca	2-metil- 1-Propanol (80); 1,4-Benzenodiol (81); 3-metil-1-Butanol (82); 2-metil-1-Butanol (83); 1,2,4-Tritiolano (84); 1,2,4,5-Tetratiano (85); 4'-Hidroxi-3'-metilacetofenona (86); S-Metil metanotiosulfonato (87); Dimetil trissulfeto (88); Dimetil tetrassulfeto (89); S-Metil tiometanosulfonato (90); Metil (metilsulfonyl) metil sulfeto (91); 2,3-Diido-3,5-dihidroxi- 6-metil-4-pirona (92); metil (metilsulfinil) metil Dissulfeto (93); metil (metiltio) metil dissulfeto (94); Bis (metiltiometil) dissulfeto (95); bis (metildissulfeto) metano (96); Metiltiometil (metilsulfonyl) metil dissulfeto (97); dissulfeto, (metilsulfonyl) metil (metiltio) metil (98); metil (metiltio) metil Trissulfeto (99); Dissulfeto, (metilditio) metil (metiltio) metil (100); Dissulfeto, (etilditio) metil (102); 2,3,5,7-Tetrataioctano (101); dissulfeto, bis [(metilsulfinil)metil] (103).	BARBOSA, 1999
	folha	p-Hidroquinona (104); 4'-Hidroxi-3'-metilacetofenona (105); metanotiosulfonato de metila (106); dissulfeto de metil (metilsulfonyl) metil (107); 3-Oxo- α -ionol (108); α -Tocoferol (109)	BARBOSA <i>et al.</i> , 1997

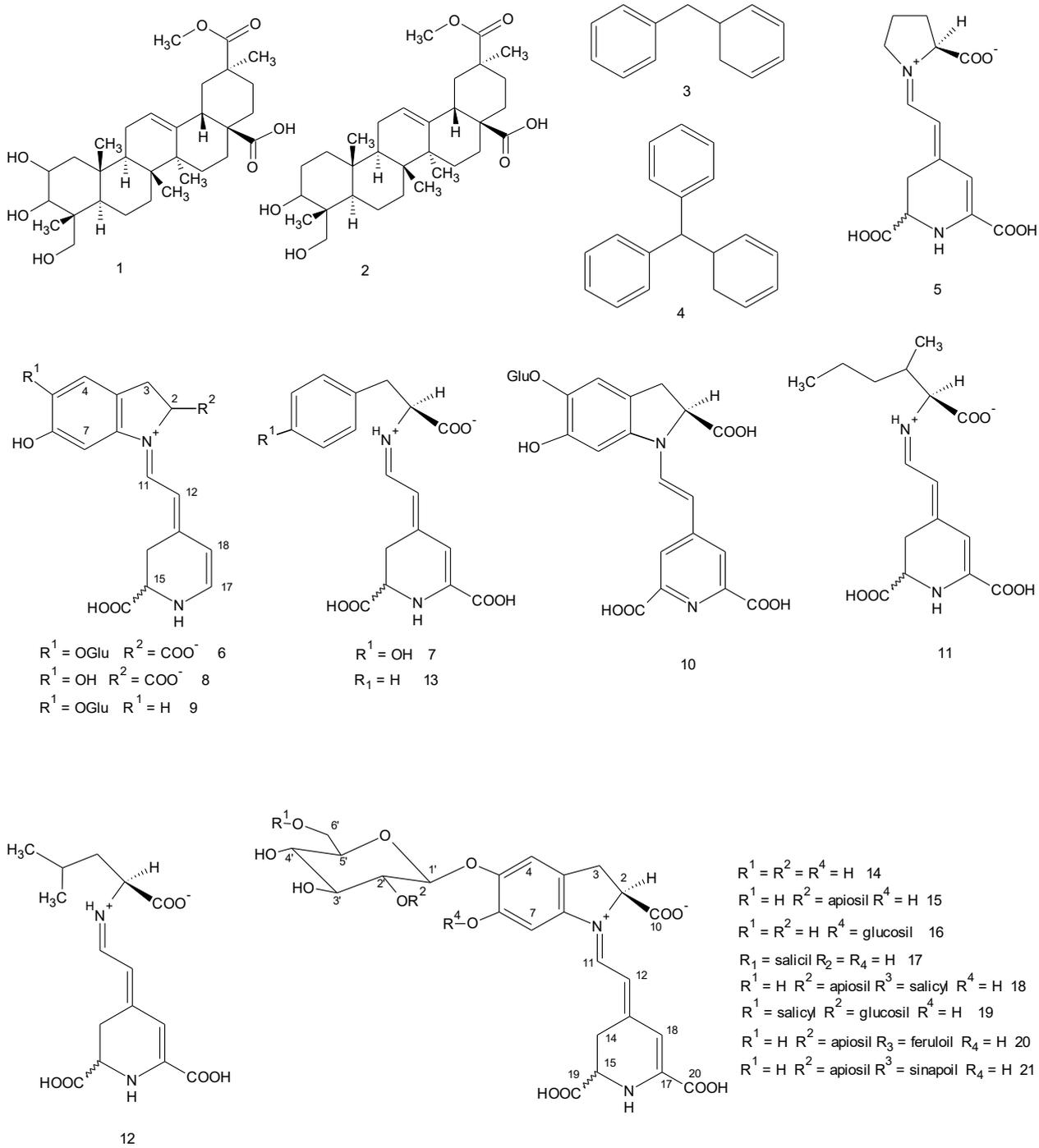


Figura 2: Diversas substâncias presente na família Phytolaccaceae.

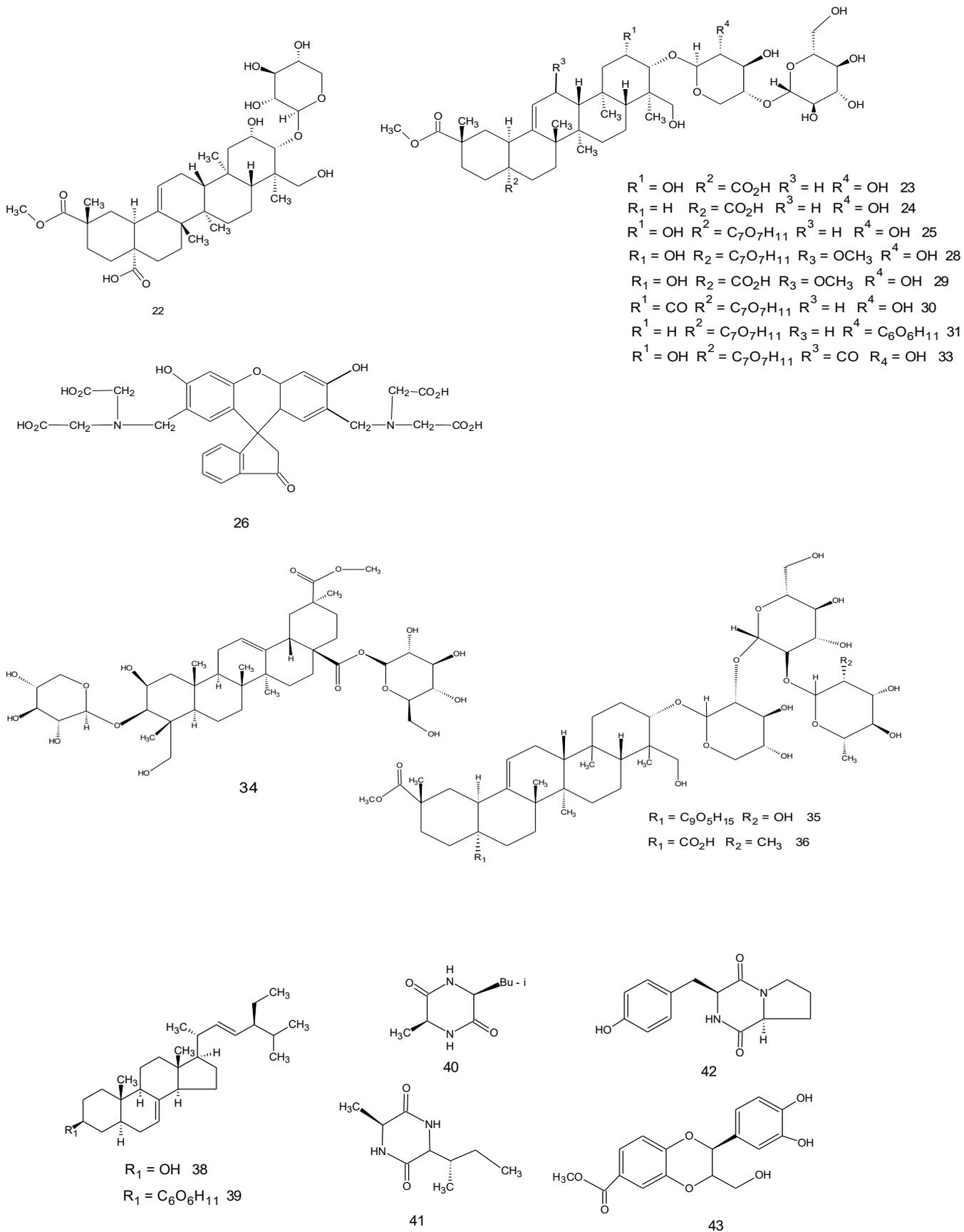


Figura 2: Diversas substâncias presente na família Phytolaccaceae (continuação).

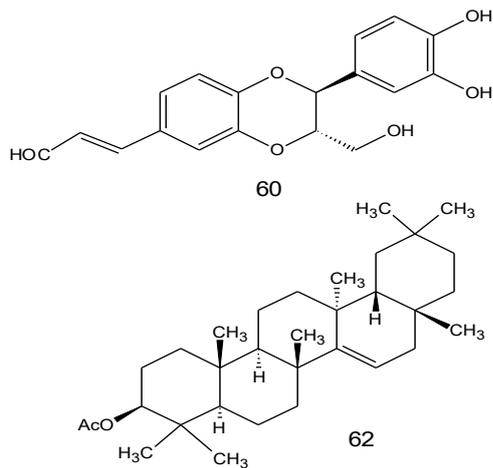
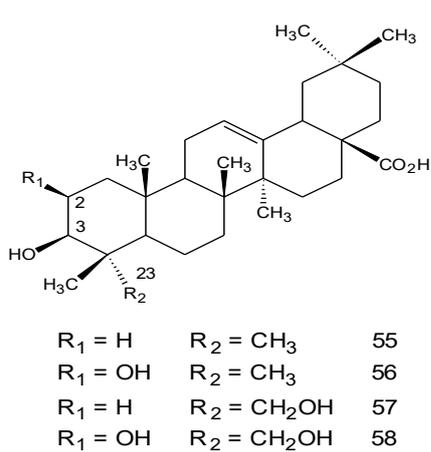
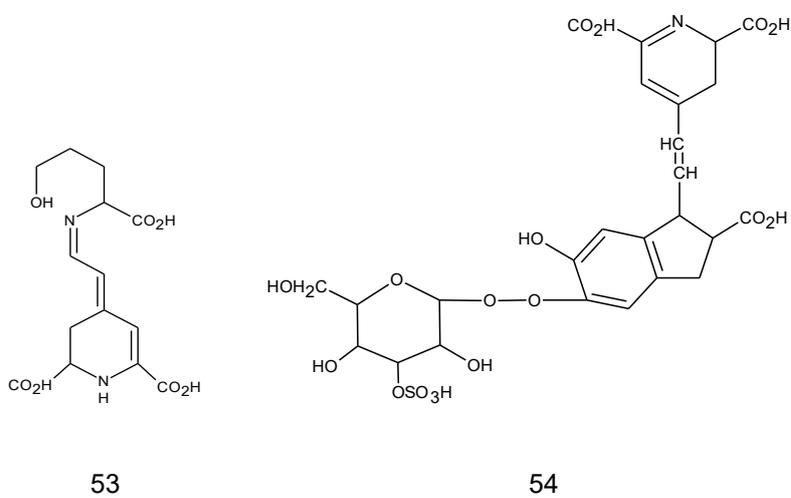
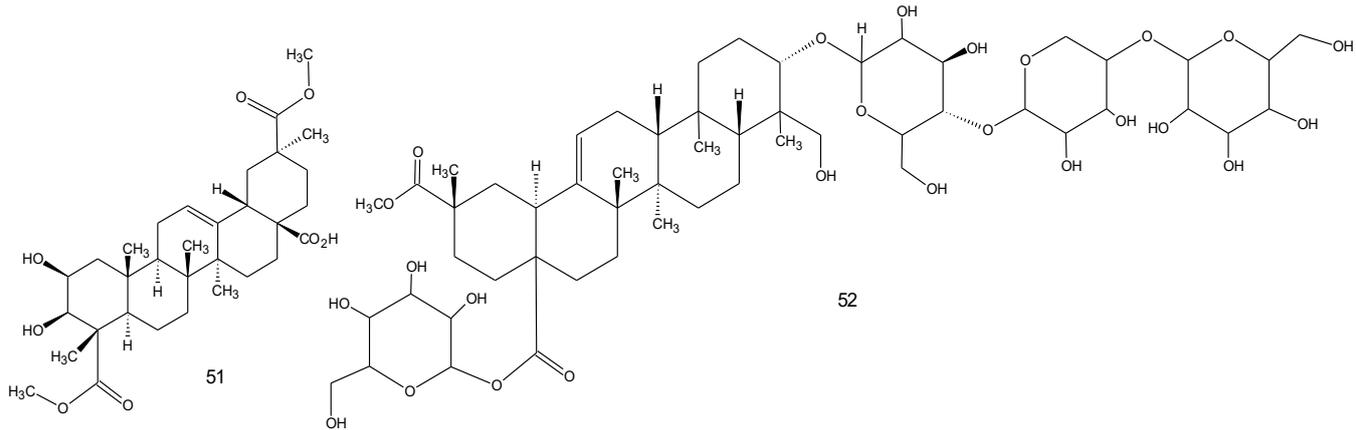


Figura 2: Diversas substâncias presente na família Phytolaccaceae (continuação).

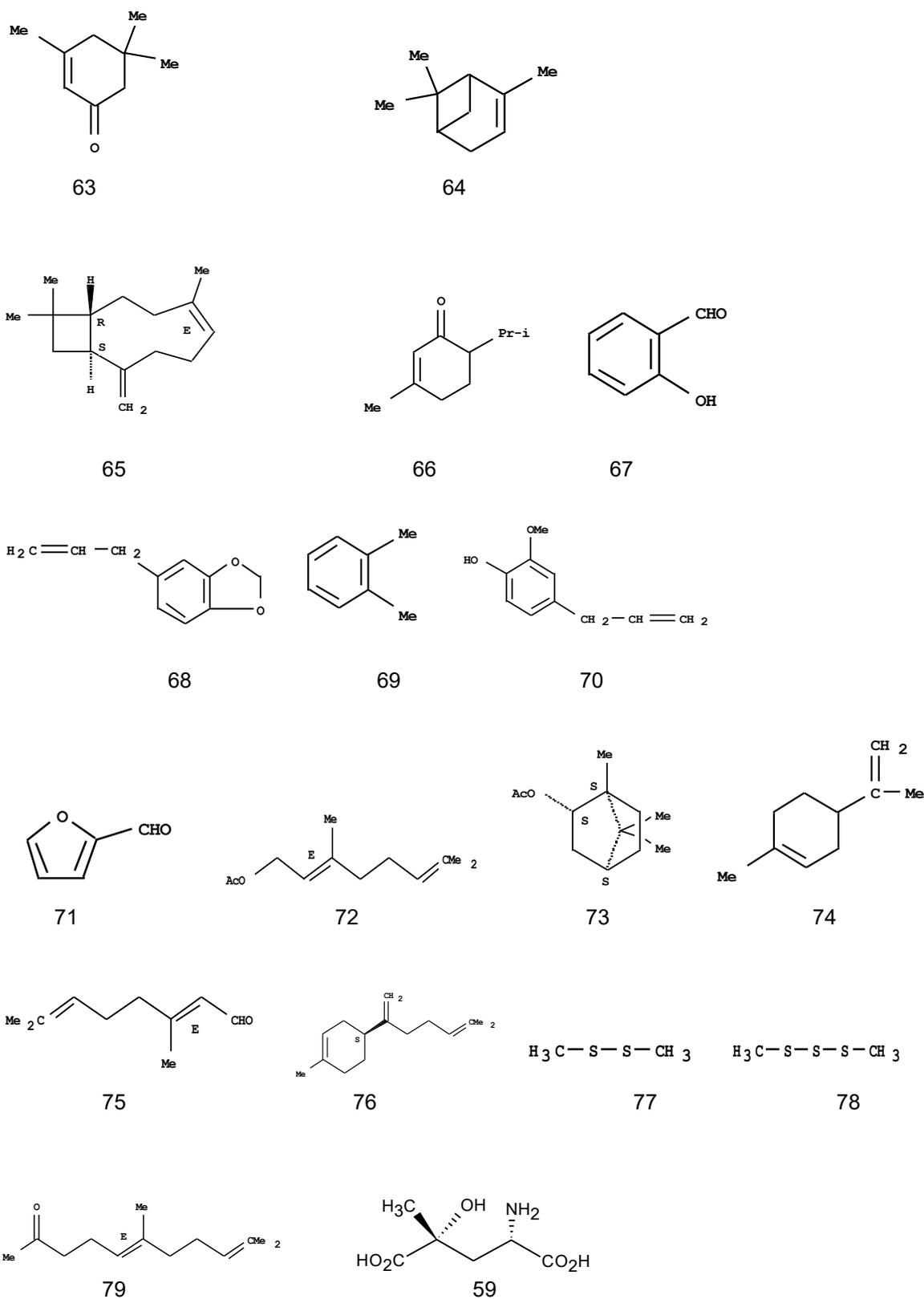


Figura 2: Diversas substâncias presente na família Phytolaccaceae (continuação).

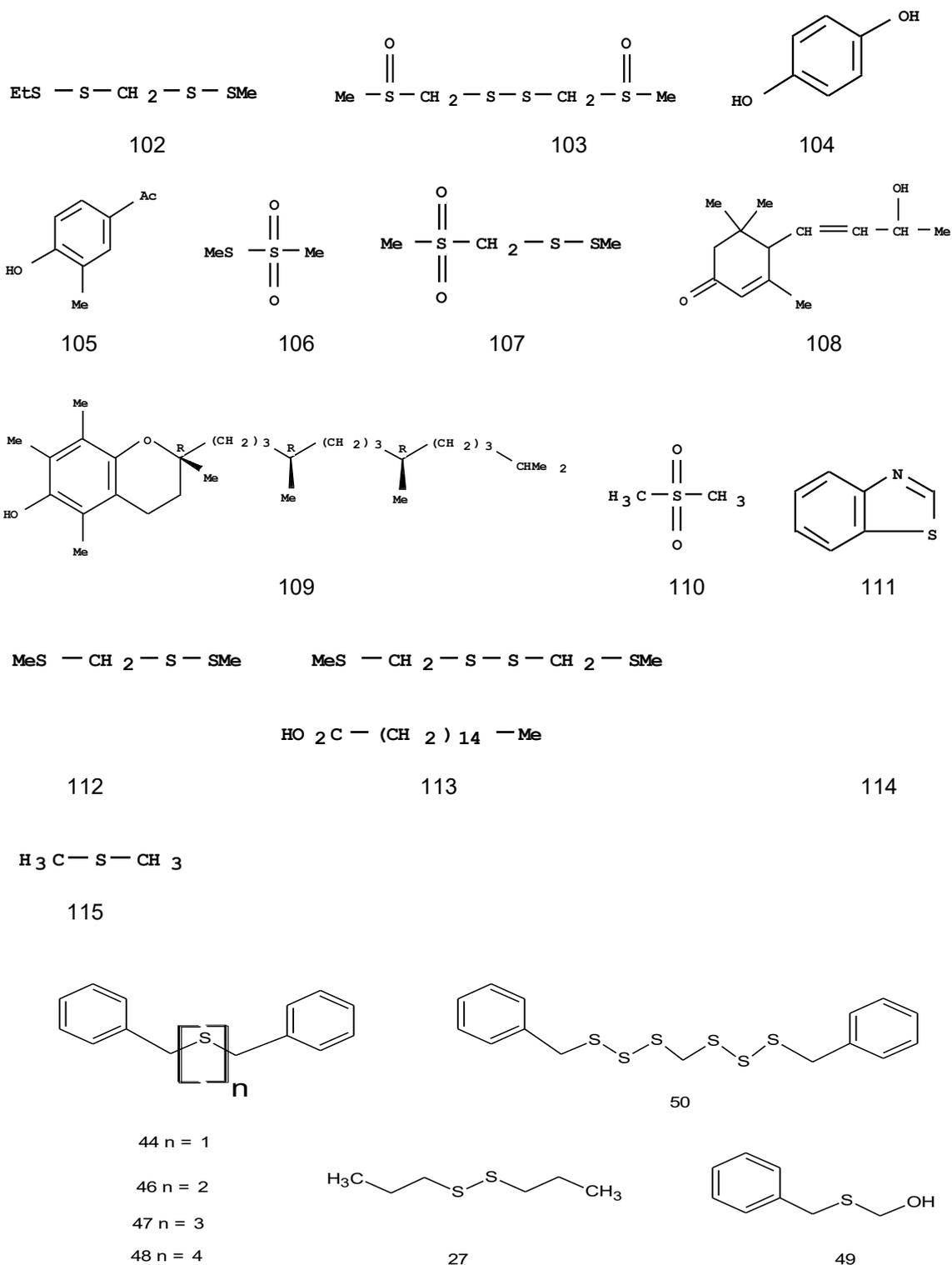


Figura 2: Diversas substâncias presente na família Phytolaccaceae (continuação).

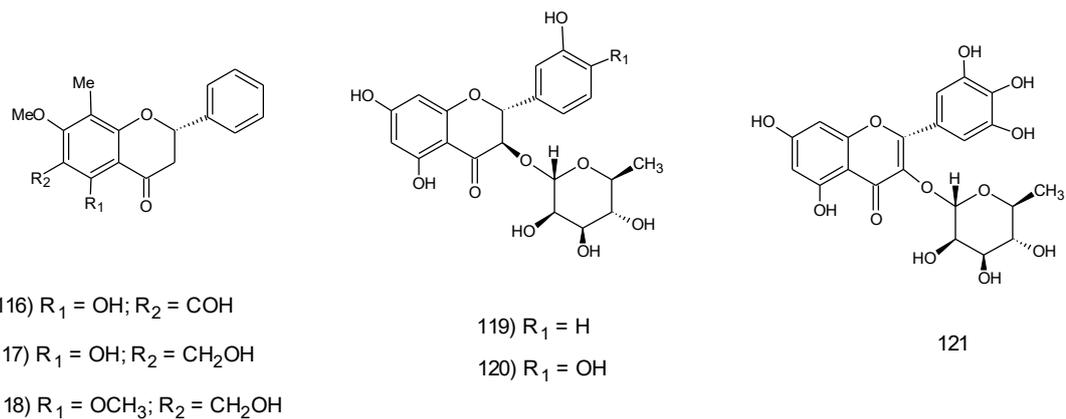


Figura 2: Diversas substâncias presente na família Phytolaccaceae (continuação).

2.3.3 A espécie *Gallesia integrifolia* (Spreng) Harms

A espécie vegetal *Gallesia integrifolia* (Spreng) Harms (figura 3, pág. 23), pertencente à família Phytolaccaceae é conhecida popularmente por Pau d'algo, Gorarema, Guararema, Ibararema e Ubirarema. Apresenta as seguintes sinonímias científicas: *Crataeva gorarema*, *Gallesia acorododendron* e *Gallesia gorarema* (AKISUE; AKISUE; OLIVEIRA, 1986).

A espécie foi descrita pela primeira vez por Sprengel em 1821 sob o nome de *Thouinia integrifolia* spreng (KNGLER; PRANTL, 1934 apud AKISUE; AKISUE; OLIVEIRA, 1986).



Figura 3: Folhas *Gallesia integrifolia* (Spreng) Harms. (Fonte: acervo pessoal)

Essa espécie ocorre nas formações florestais do complexo atlântico, em vários estados brasileiros, desde o Ceará (latitude 04° S) até o Paraná (latitude 25° 30' S). Ocorre preferencialmente em terrenos profundos, úmidos e de alta fertilidade, sendo considerado padrão de terra de boa qualidade. Portanto, esta ampla distribuição geográfica envolvendo ambientes com características de solo e clima muito diferentes é um indicativo de alta variação genética na espécie (SATO *et al.*, 2004).

G. integrifolia possui hábito arbóreo de grande porte, com 15 a 30 m de altura e 70 a 140 cm de diâmetro do tronco, floresce de fevereiro até abril e seus frutos amadurecem no período de setembro a outubro, quando adquirem coloração parda (LORENZI, 2002 *apud* RODRIGUES, 2010). Seus frutos são indeiscentes tipo sâmara, que facilita a dispersão e segundo Barros, Silva e Aguiar (2005), suas sementes germinam tanto em ambientes com claridade com baixa umidade e alta quantidade de luminosidade como também em ambientes de mata fechada com alta umidade e baixa luminosidade, correspondendo aos diferentes ambientes encontrados ao longo das trilhas.

Espécies de *Gallesia* possuem madeira de múltiplo uso, empregada principalmente em serrarias e na produção de energia, sendo utilizadas também para a fabricação de celulose e papel em substituição ao pinheiro brasileiro (*Araucaria angustifolia*) (FREITAS *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2010).

A madeira e outras partes da planta exalam um forte odor característico de alho quando verde, por isso é denominada vulgarmente de pau-d'alho, nome válido em todo o País, e que no comércio internacional recebe a denominação “*Garlic Wood*” (LIMA *et al.*, 2010).

Há relatos da utilização do pau d'alho, na medicina popular, no tratamento externo de otite, verminoses, gonorréia, reumatismo, em combate a tumores da próstata (AKISUE; AKISUE; OLIVEIRA, 1986; CORREA FILHO, 1984). Há também relatos etnobotânicos de utilização desta espécie no caso de dores nas pernas (CARNEIRO, 2009) e o uso de suas folhas e caule são indicados como hipotensores e redutores da taxa de colesterol (FEIJO, 2008), e utilizado para o tratamento de asma e bronquite (BUSSMANN; GLENN, 2010).

Substâncias naturais contendo enxofre, encontradas nesta espécie, freqüentemente exibem diversas atividades biológicas, tais como propriedades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica contra certas células cancerígenas (ANWAR *et al.*, 2008).

Dentre os microorganismos que podem ser inibidos por extratos vegetais, encontra-se que o *Staphylococcus aureus*, que é uma bactéria pertencente ao grupo dos cocos gram-positivos que está presente na microbiota humana, mas que pode provocar doenças que vão desde uma infecção simples, como acnes e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia, entre outras. Algumas cepas deste patógeno tornaram-se resistentes aos antibióticos de diferentes grupos farmacológicos (SANTOS *et al.*, 2007) e por este motivo, o descobrimento de novas substâncias com potencial antibacteriano faz-se necessário e importante.

Já as leveduras de *Candida albicans* são patógenos oportunistas, que constituem a principal causa de disseminação de infecção fúngica, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos, diabéticos, neonatos e pacientes pós-operatório. Estudos representativos de fungemia para estes pacientes mostram que *C. albicans* é responsável por 60-80% dos casos, seguido por 12-20 % causado por *C. tropicalis*, mostrando assim o potencial invasivo dessas espécies (BENDEL; HOSTETTER, 1993). Uma vez que esses microorganismos apresentam resistência a muitos antimicrobianos atuais, faz-se necessária a realização de estudos *in vitro* acerca da ação antifúngica de extratos naturais, podendo estes, futuramente, tornar-se uma alternativa no tratamento de infecções oportunistas, causadas por estas espécies patogênicas.

3 METODOLOGIA

3.3 ESCOLHA DA PLANTA ESTUDADA

A espécie *Gallesia integrifolia*, conhecida popularmente como pau d'alho, é citada pela população de Comunidades Quilombolas e Assentados da Região Norte Fluminense como uma planta medicina utilizada para o tratamento de gripe, bronquite, inflamação, calmante, memória e micose. Além disso, há poucas

informações científicas sobre os aspectos taxonômicos, fitoquímicos e/ou farmacológicos desta planta.

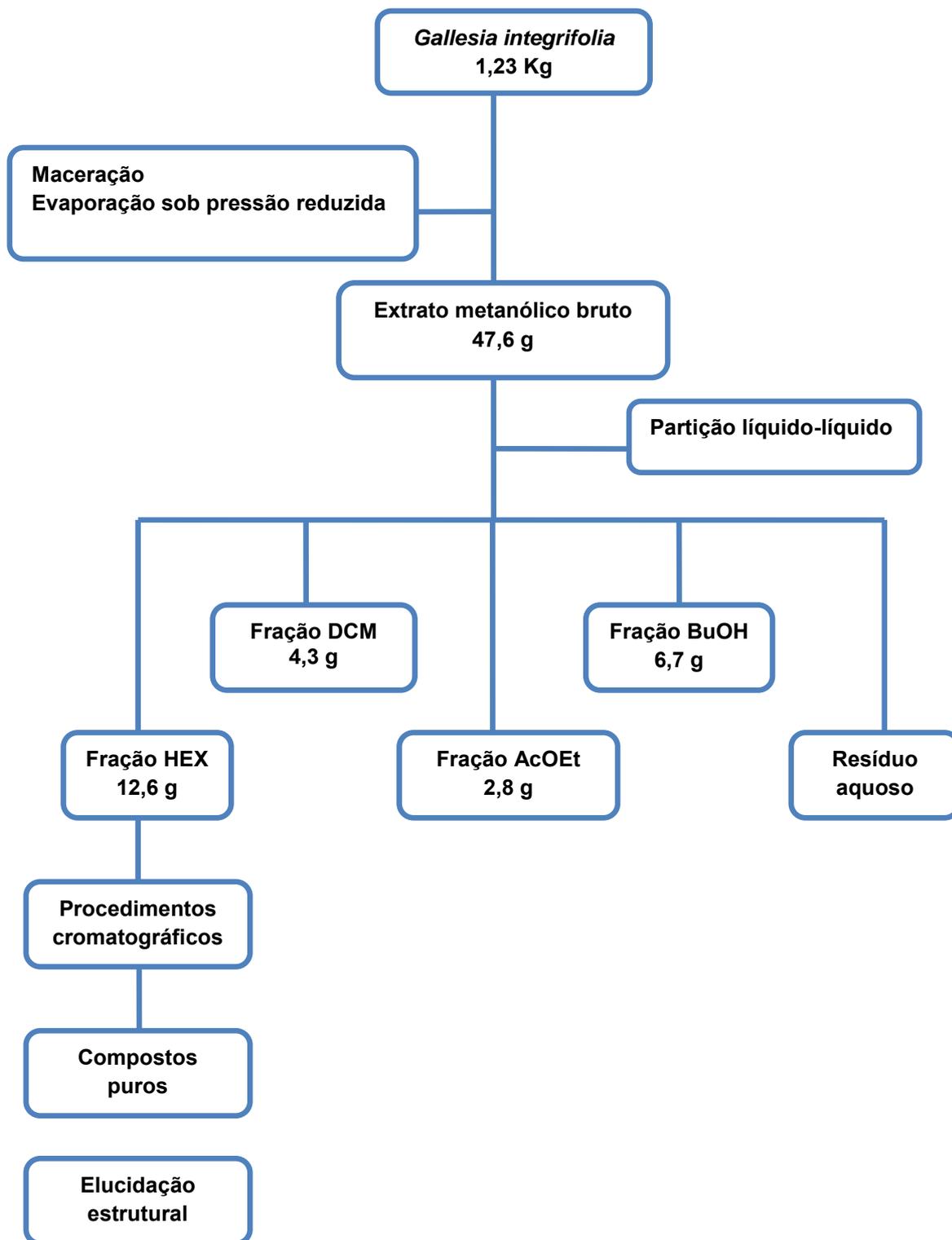
3.4 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas da *Gallesia integrifolia* foram coletadas na cidade de Quissamã, em abril de 2010. A exsicata foi depositada no herbário da UENF, nº H8389.

As folhas foram secas ao ar livre, em temperatura ambiente, e posteriormente foram trituradas em liquidificador (marca SIELD).

O material vegetal triturado e com massa definida (1, 23 Kg) foi submetido à maceração exaustiva com metanol, filtrado e o solvente evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo. O extrato concentrado foi congelado, e em seguida, liofilizado para que todo o resíduo de água fosse retirado. Após a obtenção do extrato bruto, este foi submetido a um fracionamento por partição líquido-líquido, utilizando um gradiente de polaridade crescente de solventes orgânicos [hexano, diclorometano, acetato de etila, n-butanol.

O procedimento realizado encontra-se resumido no esquema 1 (página 27).



Esquema 1: Fluxograma dos procedimentos realizados com o extrato das folhas de *G. integrifolia*.

3.5 PERFIL CROMATOGRÁFICO, SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO

As frações foram submetidas a uma análise preliminar, para determinação prévia dos melhores sistemas de eluição e reveladores e em seguida, às diversas técnicas cromatográficas para purificação de seus componentes e posterior elucidação dos mesmos.

As revelações das manchas cromatográficas foram realizadas através de detecção por irradiação ultravioleta com lâmpada a 254 nm e 365 nm e utilizando vanilina 1% etanólica em H₂SO₄ como reveladores universais, seguidas de aquecimento.

Após determinação do perfil cromatográfico, as amostras foram submetidas à cromatografia em coluna aberta (CC) com sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) como fase estacionária, e, como fase móvel, solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade. O sistema de solvente foi escolhido de acordo com o perfil cromatográfico em cromatografia em camada delgada (CCD) das frações. O diâmetro e altura das colunas foram variados de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada.

3.6 IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS PUROS

Todas as substâncias isoladas foram submetidas à elucidação estrutural por espectroscopia de RMN ¹H, RMN ¹³C, COSY, HMQC, APT e HMBC. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN¹³C) uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro BRUKER, Modelo DPX-500 (¹H-500 MHz e ¹³C-125 MHz)

3.7 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL DO ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS FOLHAS DA *GALLESIA INTEGRIFOLIA*

3.7.1 Fração hexânica

Uma alíquota de 4,0 g da fração de hexano foi cromatografada em coluna de vidro sobre sílica gel 60, utilizando-se como eluente a mistura de hexano/acetato de etila em diferentes proporções, com aumento gradual de polaridade. Foram coletadas 201 frações de aproximadamente 50 mL, as quais foram secas, pesadas e reunidas em 13 subfrações, de acordo com o perfil cromatográfico analisado em CCD, conforme apresentado na tabela 9 (pag. 29). As subfrações foram selecionadas para identificação e purificação de seus componentes de acordo com o melhor grau de pureza e maior massa apresentada.

Tabela 9: Análise cromatográfica do extrato hexânico de *G. integrifolia*.

Frações	Código da amostra	Quantidade (mg)	Observação
28 a 29	GFH 1	44,3	°
30 a 36	GFH 2	620,3	°
37 a 42	GFH 3	458,0	°
43	GFH 4	43,9	°
44 a 56	GFH 5	699,7	°
57 a 82	GFH 7	317,4	*
83 a 93	GFH 10	79,3	°
94 a 104	GFH 12	104,4	°
105 a 125	GFH 13	133,2	°
126 a 142	GFH 15	99,9	°
143 a 161	GFH 16	143,5	*
162 a 197	GFH 18	777,7	°
198 a 201	GFH 19	210,1	*

* Amostras não trabalhadas.
° Amostras selecionadas para purificação de seus componentes.

A subfração 30-36, cujo código é GFH 2, apresentando 620,3 mg, foi submetida a uma CC utilizando-se sílica gel (0,063 – 0,200 mm) como fase estacionária e eluída com hexano e diclorometano em ordem crescente de polaridade, obtendo 101 frações, das quais foi obtido o triterpeno **GFH 2.5**, com 56 mg.

A subfração 37-42, cujo código é GFH 3, apresentando 458,0 mg, foi submetido a uma CC, utilizando-se sílica gel (0,063 – 0,200 mm) como fase estacionária e eluída com hexano e diclorometano em ordem crescente de polaridade. Obteve-se 94 frações, destas foi possível isolar o diterpeno **GFH 3.9**, com 84 mg.

A subfração 94-104, cujo código é GFH 12, apresentando 104,4 mg, foi submetida a uma CC utilizando-se sílica gel (0,063 – 0,200 mm) como fase estacionária e eluída com diclorometano e metanol em ordem crescente de polaridade, obtendo 246 frações. Foram obtidas a porfirina **GFH 12.6**, apresentando 21,8 mg.

3.7.2 Fração diclorometânica

Cerca de 500 mg da fração em diclorometano foi submetida a CC utilizando-se sílica gel (0,063 – 0,200 mm) como fase estacionária e eluída com hexano e acetato em ordem crescente de polaridade, obtendo 37 frações. As quais foram reunidas de acordo com o perfil observado em CCD, e a fração 9-12, cujo código é GFD 4, com 10 mg foi recromatografada e possível obter dois triterpenos, em mistura, **GFD 4.1**, apresentando 2,3 mg.

Uma parte da fração em diclorometano (425,2 mg) foi submetida à Cromatografia Contracorrente de Alta Performance (HPCC). Inicialmente, escolheu-se o sistema de solvente a ser utilizado pelo método de agitação em tubo de ensaio (BERTHOD; CARDA-BROCH, 2004). Uma alíquota da amostra (1 mg) foi solubilizado em 1mL da fase orgânica e 1 mL da fase aquosa de cada sistema de solvente proposto, seguido de repouso para restabelecimento das fases. Posteriormente, foi realizada análise quantitativa do perfil químico das fases, na mesma proporção, por CCD.

Foram testados 14 sistemas de solventes quartenários denominados Arizona, em diferentes proporções, sendo que 11 foram de acordo com Berthod, Hassoun e Ruiz-Angel (2005) como mostra a tabela 10 (pag. 31). O sistema de solvente escolhido foi o que apresentou melhor separação e melhor solubilidade dos componentes da amostra em ambas as fases, HEX: AcOEt: MeOH: H₂O, na proporção 1:2,5:2,5:1 (sistema 2).

Tabela 10: Sistemas de solvente testados na partição diclorometânica do extrato metanólico de *G. integrifolia*.

Sistema	Hexano	AcOEt	MeOH	H ₂ O
C	1	9	1	9
H	1	3	1	3
K	1	2	1	2
L	2	3	2	3
M	5	6	5	6
N	1	1	1	1
P	6	5	6	5
Q	3	2	3	2
R	2	1	2	1
T	3	1	3	1
X	9	1	9	1
1	1	2	2	1
2	1	2,5	2,5	1
3	1	2	2,5	1

O aparelho de HPCC marca Knauer (Advanced Scientific Instruments) foi mantido na temperatura de 22°C durante a análise, primeiramente ele foi preenchido com a fase estacionária (fase orgânica do sistema 2), no fluxo contínuo de 1.0 mL.min⁻¹ até sua capacidade máxima (142 mL), após o total enchimento a rotação foi iniciada (1200 rpm) e a fase aquosa deste sistema de solvente (fase móvel) foi bombeada para a coluna, através de bombas Smartline pump 100. Estabelecido o equilíbrio hidrodinâmico (sangramento de 28 mL – 80,2% de retenção de fase estacionária) a fração em diclorometano foi aplicada em um loop de 5 mL e injetada no aparelho. A eluição da fase móvel foi coletada em frações de 4 mL por tubo. Após 57 frações a fase móvel do sistema 2 a rotação foi desligada e iniciou-se o processo de limpeza da coluna (solvente metanol, fluxo 4,0 mL.mim⁻¹).

As frações obtidas no HPCC foram analisadas em cromatografia em camada delgada, reveladas com vanilina, e reunidas em 27 frações. As frações **GFDC 12** (7,0 mg) e **GFDC 15** (5 mg) apresentaram-se puras, sendo duas porfirinas. Através da elucidação foi verificado que a substância GFDC 12 era a mesma que GFH 12.6.

3.8 Ensaios microbiológicos com o extrato metanólico bruto e suas partições

A avaliação da atividade antimicrobiana da espécie *G. integrifolia* foi realizada em colaboração com o Laboratório de Sanidade Animal (LSA), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, supervisionado pelo professor Olney Vieira da Motta.

Foram utilizadas quatro linhagens da bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*, duas linhagens de *Candida albicans* e uma linhagem de *Candida tropicalis* (tabela 11, pag. 32).

Tabela 11: Microorganismos utilizados nas análises antimicrobianas.

Bactéria	Linhagem
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923 (padrão)
	LSA 88 - cepa produtora das enterotoxinas, isolada de amostra de leite de vaca SEC/SED (Vieira-da-Motta <i>et al.</i> , 2001)
	COL - resistente à meticilina (MRSA)
	Clínica – isolada de origem humana
Fungo	Linhagem
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 (padrão)
	Clínica
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 28707 - origem humana

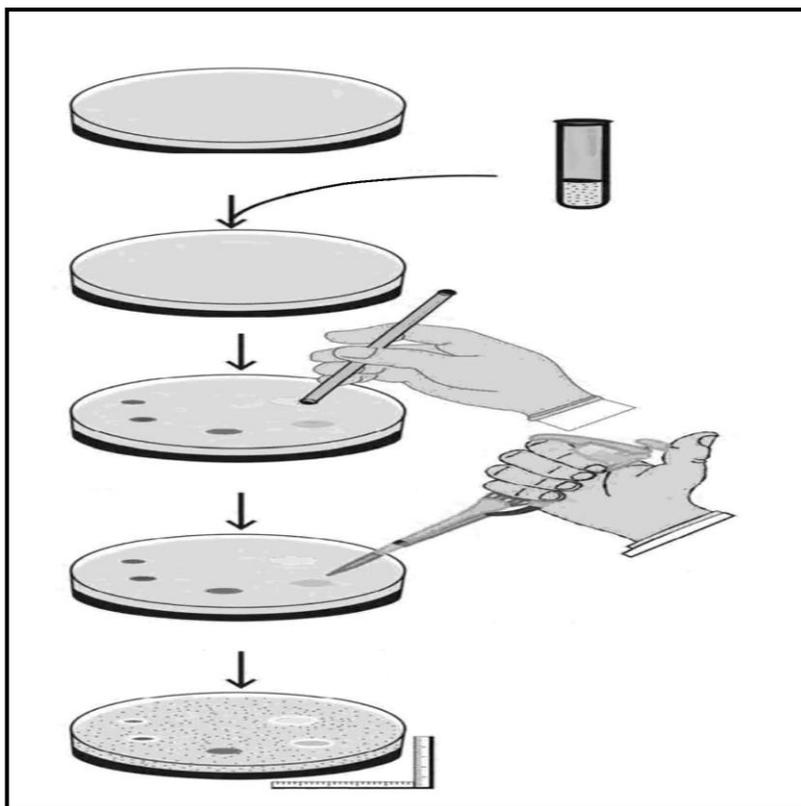
Para obter o crescimento dos microorganismos, cada cepa de *S. aureus* e *C. albicans* e *não albicans* foram cultivadas em agar Mueller Hinton (Himedia) e Sabouraud dextrose (Himedia), respectivamente.

3.8.1 Ensaio de inibição do crescimento de *S. aureus* e *Candida* pelo teste de difusão em Agar

No método de difusão em Agar por cavidade em gel (BAUER *et al.*, 1966) adaptado por Koneman *et al.*, (1993) e Romeiro (2001), as suspensões dos inóculos dos microorganismos foram semeadas (100 µL), com auxílio de um suabe estéril, em placas de Petri previamente preparadas com Agar Mueller Hinton ou Sabouraud dextrose (Himedia), respectivamente.

Em cada placa previamente semeada foram perfurados orifícios circulares (mini-poços), com perfurador de 5 mm de diâmetro, onde foram preenchidos com 50 µL de cada uma das frações (esquema 2, pág. 34). Como controles positivos foram utilizados os antibióticos gentamicina e oxacilina (200 µg/poço) para as bactérias e os antifúngicos itraconazol e terbinafina (1mg/poço) para os fungos. E como controle negativo foi utilizado o DMSO P.A. Após incubação das placas por 24hs, em estufa a 37°C para as bactérias e a 28 e 37°C para as Candidas, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com o auxílio de um paquímetro. Os resultados dos testes foram interpretados por comparação com os controles positivos. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Os resultados foram avaliados de acordo com o diâmetro (mm) dos halos formados ao redor dos poços contendo as partições. Foi considerado como resultado final de cada amostra a média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos discos nas três repetições, partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microorganismos (OSTROSKY *et al.*, 2008). Foi considerado suscetível halo igual ou acima de 8 mm de diâmetro (DANTAS *et al.*, 2010).



Esquema 2: Técnica de difusão em poços para avaliação de atividade antimicrobiana (GELINSKI *et al.*, 2007).

3.8.1 Ensaios de inibição do crescimento de *S. aureus* e *Candida* pelo teste em meio de cultura líquido

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

Inicialmente, foi realizado o preparo do inóculo, onde foi selecionado 4 a 5 colônias da bactéria, transferido para uma ampola de vidro de 10 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85 %) e homogeneizado. Em seguida, a turbidez do inóculo foi ajustada por espectrofotometria a 550 nm (densimat®, bioMérieux, França), por comparação com a escala de 0,5 de Mc Farland (equivalente a 10^8 células/mL).

Com o auxílio de uma micropipeta, foi distribuído um volume de 1800 µl de caldo BHI ou SAB (Acumedia, EUA) em ampolas de vidro e em seguida 100 µl de

inóculo e 100 µl das frações Hexano, acetato de etila, diclorometano e n-butanol. Foram chamados de “controles negativos” os ensaios em que foram utilizados alíquotas de 100 µl do solvente Dimetilsulfóxido (DMSO), e como “controles positivos” ensaios com as alíquotas dos antibióticos gentamicina e oxacilina (200µg/mL) quando o ensaio foi realizado com cepas bacterianas e os antifúngicos itraconazol e terbinafina (1mg/mL) quando os ensaios foram realizados com as cepas fúngicas.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Após estes procedimentos, os tubos foram levados à estufa de incubação a 37°C e leituras periódicas de densidade óptica foram realizadas em intervalos de 1h. A última leitura foi feita quando o controle atingiu a capacidade máxima de leitura do fotômetro (igual a 7.5 da escala MacFarland).

3.8.2 Atividade de antibióticos após tratamento com os extratos de *G. integrifolia*

Antibiogramas foram realizados expondo as linhagens de *S. aureus* tratadas de acordo com CARLOS *et al.* (2010). Resumidamente, 100 µl da suspensão bacteriana após tratamento com os extratos foram semeados em placas contendo Agar Mueller Hinton (HIMEDIA) e em seguida discos de antibióticos foram aplicados. Os discos de antibióticos utilizados foram: clindamicina (CLI, 2 µg), oxacilina (OXA, 1 µg), Vancomicina (VAN, 30 µg), gentamicina, cefalexina (CFL, 30 µg), Sulfametoxazol + trimetropina (SUT, 25 µg) e gentamicina (GEN, 30 µg).

3.8.3 Avaliação da bioatividade do extrato bruto de *G. integrifolia* pelo teste de diluição em série

Este método foi realizado como uma alternativa para avaliar a atividade biológica do extrato bruto pelo fato do mesmo apresentar alta turbidez que impediu deste ser lido através do espectrofotômetro durante o teste em meio líquido.

Para o teste foram preparados tubos para diluição seriada contendo 3,0 mL de caldo Broth Brain Infusion (BHI) (Himedia) para as bactérias e caldo Sabouraud dextrose (Himedia) para as cepas de *Candida albicans* e não albicans. O

plaqueamento foi realizado também em BHI para bactérias e Sabouraud dextrose para as cepas de *Candida albicans* e não albicans.

O extrato bruto de *G. interglifolia* foi diluído em DMSO P.A (Sigma Aldrich, Brasil) na concentração de 100mg/mL. Em seguida, 1 mL do extrato diluído foi adicionado a 3 mL de caldo BHI ou SAB (Himedia) contido em uma ampola de vidro correspondendo a primeira diluição (33 mg/mL). Em seguida transferiu-se 1 mL do primeiro tubo para o segundo tubo e assim sucessivamente até o quinto tubo, de maneira a se obter uma diluição seriada do extrato bruto. A cada tubo foi adicionado uma alíquota de 0,1 mL de uma suspensão das cepas de bactérias *S. aureus* ou de *C. albicans* padronizado pela turvação equivalente a 0,5 da escala Mcfarland em solução salina 0.85%. Após os tubos serem incubados a 37°C por 24hs, 0,1 mL do cultivo foram semeados em placas contendo Agar Broth Heart Infusion para as bactérias e agar Sabouraud dextrose para as cepas de *Candida*. Em seguida essas placas foram incubadas por 24hs a 37°C e realizada a contagem de unidades formadoras de colônias obtidas após o tratamento. Os resultados foram comparados com o controle contendo somente caldo BHI ou SAB e os seus respectivos microorganismos (*S. aureus* ou *Candida*) (LEMOS *et al.*, 2000).

Para as cepas de *Candida* o teste foi realizado nas temperaturas de 28 e 37°C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Substâncias isoladas do extrato metanólico bruto das folhas de *Gallesia integrifolia*.

O estudo fitoquímico da partição hexânica e diclorometânica das folhas de *G. integrifolia* levou ao isolamento de 6 substâncias (Figura 4, pág. 37), sendo 2 porfirinas, 3 triterpenos e 1 diterpeno, todas descritas pela primeira vez na espécie estudada.

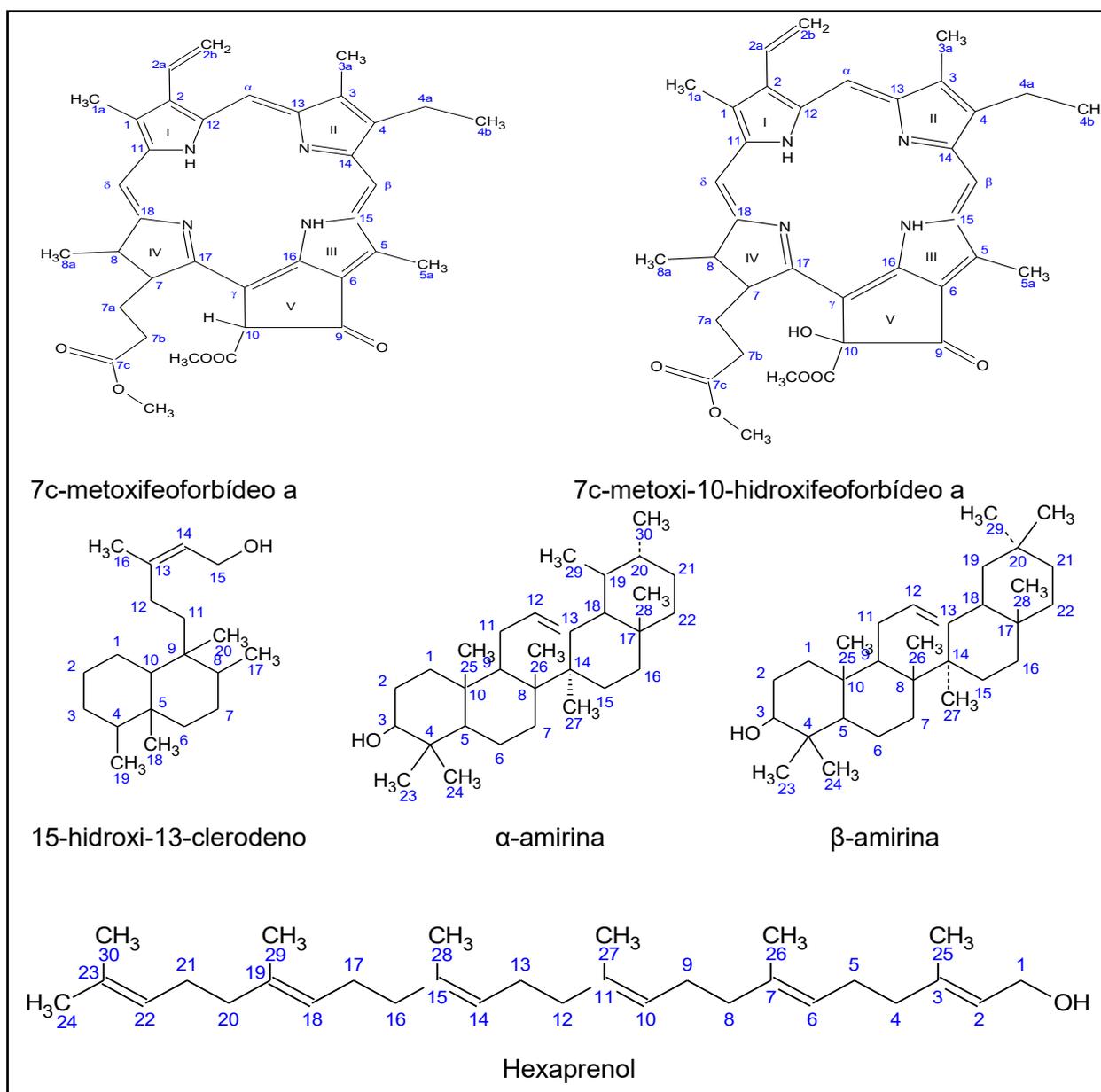
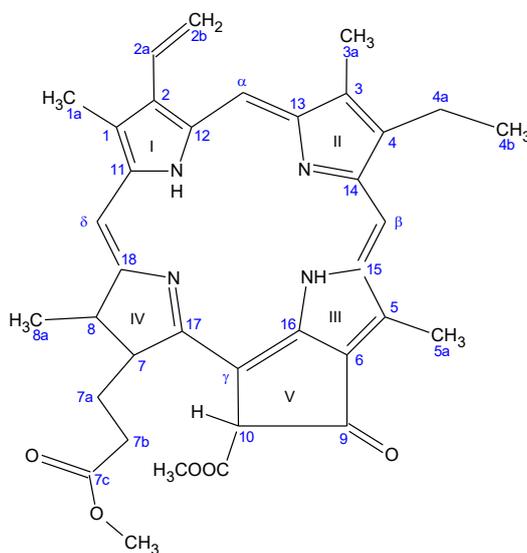


Figura 4: Substâncias isoladas de *G. integrifolia*.

4.1.1. Caracterização da substância GFDCC 15



GFDCC 15

As porfirinas e os seus derivados compreendem um grande grupo, constituído por uma estrutura macrocíclica assimétrica totalmente insaturada compreendendo quatro anéis de pirrol, enumerados de 1 a 4, conforme o sistema de numeração de Fisher (SCHOEFS, 2002). As diferenças estruturais nas porfirinas são provenientes do grau de insaturação dos anéis, da composição das cadeias laterais aos anéis pirrólicos e das posições axiais do macroclico (STERNBERG; DOLPHIN; BRUCKNER, 1998).

Os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários foram obtidos através da análise do espectro HBMC, que mostra o acoplamento entre os átomos de hidrogênio e carbono a duas e a três ligações.

O espectro de RMN ^1H (figura 5, pág. 42) de GFDCC 15 e suas expansões (fig. 6-8, pág. 43 a 45) exibiram absorções que corroboram a sugestão que GFDCC 15 trata-se de uma substância com núcleo porfirínico. Esta sugestão foi fortalecida ao observarmos sinais para quatro metilas de anéis pirrólicos em 3,40 (Me-1a); 3,20 (Me-3a); 3,75 (Me-5a) e 1,85 (Me-8a), sendo condizentes com os anéis I, II, III e IV, respectivamente (tabela 12, pág. 41). O sinal em δ 3,20 permitiu propor que esta

substância trata-se do feoforbídeo a, uma vez que o feoforbídeo b possui em C-3a um grupo aldeído (STREIT *et al.*, 2005).

A análise realizada no espectro de RMN ^1H mostrou sinais para um grupo de hidrogênios alílicos em δ_{H} 3,40 (s), 3,20 (s) e 3,75 (s) (figura 7, pág. 44), para um grupo de hidrogênios vinílicos em δ_{H} 8,02 (dd), 6,26 Ha e 6,20 Hb, confirmando a proposta para o núcleo porfirínico (fig. 6, pag. 43). Além disso, os sinais referentes aos hidrogênios olefínicos H- α (9,41s), H- β (9,54s) e H- δ (8,60s) condizente com o núcleo porfirínico do feoforbídeo a (SIANNE, 1998; Jerz *et al.*, 2007) podem ser observados na figura 6, pág. 43 e na tabela 12, pág. 41. Um simpleto em δ 3,60 (H-7d), com integração para os três hidrogênios, caracteriza o grupo metoxila e um tripleto em δ 1,70 com $J=5,0$ Hz condiz com hidrogênios do grupo CH_3 (posição C-4b), como pode ser visto na tabela 13. Já um simpleto em δ_{H} 6,28 é condizente com o hidrogênio da posição 10, indicando que o núcleo porfirínico tem um átomo de hidrogênio nesta posição. A localização do grupo C-7³ fundamentou-se quando foi comparado com os dados de GFDC 15 com o 17³-etoxifeoforbídeo (Mo-1) (Sianne *et al.*, 1998), que possui etoxila em vez de uma metoxila encontrada na substância em análise.

Os espectros de correlação bidimensional heteronuclear a duas ($^2J_{\text{CH}}$) e a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) HMBC (tabela 12, pág. 41) mostraram correlação a $^3J_{\text{CH}}$ entre os hidrogênios 2bHb em δ_{H} 6,20 e 2bHa em δ_{H} 6,33 com o carbono C-2 em δ_{C} 136,0 como também entre H-2a em δ_{H} 8,02 com C-1 em δ_{C} 142,0. Outra correlação $^3J_{\text{CH}}$ acontece entre os hidrogênios H-4b em δ_{H} 1,70 com o carbono C-4 (δ_{C} 145,0) e C-4a (δ_{C} 19,5). Estas correlações corroboram as posições 2 e 4 para os grupos vinílico e etílico, respectivamente.

Além disso, as confirmações referentes aos hidrogênios olefínicos e grupos metila foram atribuídas através do HMBC pelas respectivas correlações: H- β (δ_{H} 9,54) com C-5 (δ_{C} 129,0), com C-15 (δ_{C} 137,0) e com C-14 (δ_{C} 147,0); H- α (δ_{H} 9,41) com C-2 (δ_{C} 137,0); H- δ (δ_{H} 8,60) com C-1 (δ_{C} 134,0); Me-1a (δ_{H} 3,40) com C-11 (δ_{C} 142,0) e com C-1 (δ_{C} 134,0); Me-3a (δ_{H} 3,20) com C-13 (δ_{C} 158,0), com C-4 (δ_{C} 145,0) e com C-3 (δ_{C} 136,0); Me-5a (δ_{H} 3,75) com C-16 (δ_{C} 152,0), com C-5 e C-6 (δ_{C} 129,0) e com C-15 (137,0); Me-8a (δ_{H} 1,85) com C-18 (δ_{C} 172,0) e com C-7 (δ_{C} 51,1). As atribuições dos carbonos 9 e 10 do anel V foram feitas através das

correlações entre H-10 (δ_{H} 6,28) com C-9 (δ_{C} 192,0), com C- γ (δ_{C} 106,0), com C-16 (δ_{C} 152,0) e com C-10 a (δ_{C} 171,0).

Assim, a compilação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , em consonância com os dados da literatura (tabela 12, pág. 41) levaram a sugerir que GFDCC 15 possui a presença de um núcleo porfirínico e a ausência do grupo fitoila podendo tratar-se da **7c-metoxifeoforbídeo a**.

A análise dos espectros de RMN ^{13}C -APT e HMBC (figura 9, pág. 46 e tabela 12, pág. 41) revelou picos para 36 átomos de carbono, onde foi possível definir 18 não hidrogenados, 5 metilenos, 6 metinas e 7 metilas com destaque para o C 10b com sinal em δ_{C} 52, 8, típico de metoxila do éster. Os demais assinalamentos de carbonos no que diz a estrutura de GFDCC 15 foram determinados com base em comparação com os dados da literatura (SIANNE *et al.*, 1998 e Silva *et al.*, 2007), permitindo identificar a substância GFDCC 15 como sendo a **7c-metoxifeoforbídeo a** descrita pela primeira vez na espécie em estudo.

Tabela 12: Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da porfirina **GFDC 15**, em CDCl_3 , as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC e comparação com valores de referência do modelo **Mo-1** (17^3 -etoxifeoforbídeo) (SIANNE et al., 1998).

N° C	HMBC ($^1J_{\text{CH}}$)		HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$)	Mo-1	
	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)		^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
1	-	142,0	-	-	142,2
2	-	132,0	-	-	131,8
3	-	136,0	-	-	136,1
4	-	145,0	-	-	145,2
5	-	129,0	-	-	129,1
6	-	129,0	-	-	129,0
7	4,22 m	51,1	Não foi possível observar correlações	4,20	51,1
8	4,48 m	50,1	142,0 (17) e 23,1 (8a)	4,45	50,0
9	-	192,0	-	-	189,6
10	6,28 s	64,7	106,0 (γ); 152,0 (16); 171,0 (10a); 192,0 (9)	6,26	64,7
11	-	142,0	-	-	142,2
12	-	135,0	-	-	136,2
13	-	158,0	-	-	155,5
14	-	147,0	-	-	151,0
15	-	137,0	-	-	138,0
16	-	152,0	-	-	150,0
17	-	142,0	-	-	161,3
18	-	172,0	-	-	170,0
α	9,41 s	97,6	136,0 (2)	9,36	97,5
β	9,54 s	104,5	129,0 (5); 137,0 (15) e 147,0 (14)	9,50	104,0
γ	-	106,0	-	-	105,2
δ	8,60 s	93,0	134,0 (1)	8,55	93,1
1a	3,40 s	12,1	142,0 (11) e 134,0 (1)	3,39	12,1
2a	8,02 dd (J= 22 Hz e 14Hz)	129,1	135,0 (12)	7,98	129,0
2b	6,33 Ha d (J=22Hz) e 6,20 Hb d (J= 14Hz)	122,8	136,0 (2)	6,28 e 6,17	122,8
3a	3,20 s	11,3	158,0(13); 145,0 (4) e 136,0 (3)	3,21	11,2
4a	3,70 m	19,5	136,0 (3); 145,0 (4) e 17,4 (4b)	3,66	19,7
4b	1,70 t (J= 5Hz)	17,4	145,0 (4) e 19,5 (4a)	1,68	16,5
5a	3,75 s	12,1	152,0(16); 129,0 (5 e 6) e 137,0 (15)	3,68	12,2
7a	2,55 e 2,53 m	29,8	175,0 (7c)	X	29,8
8a	1,85 d (J= 10Hz)	23,1	172,0 (18) e 51,1 (7)	1,80	22,7
7b	2,35 e 2,65 m	31,0	Não foi possível observar correlações	X	31,2
7c	-	175,0	-	-	172,0
7d (OCH3)	3,60 s	51,7	175,0 (7c)	3,55	52,0
10a	-	171,0	-	-	173,0
10b	3,93 s	52,8	171,0 (10a)	3,88	53,0

OBS: X= sinal não fornecido pela referência

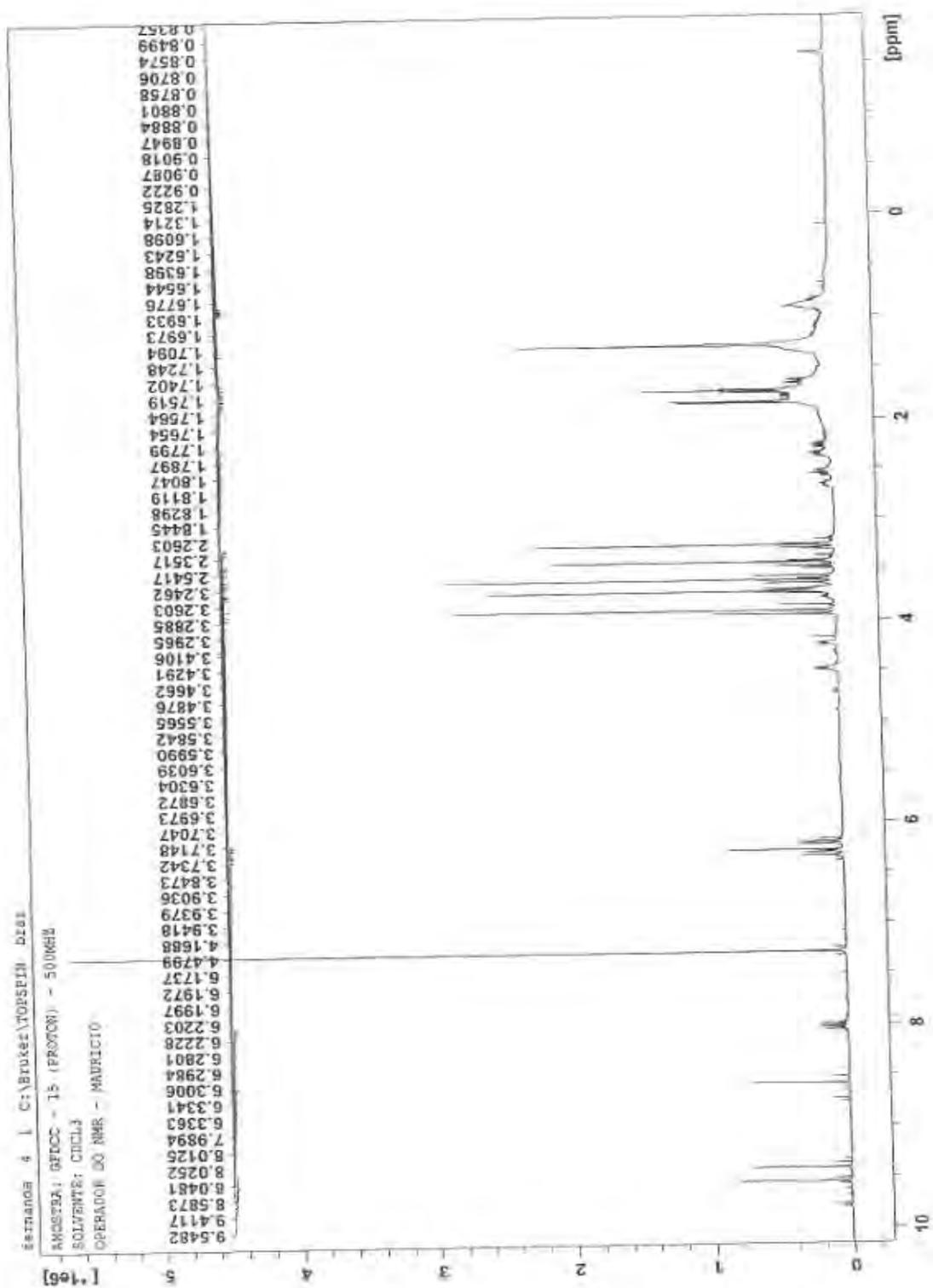


Figura 5: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de GFDCC-15.

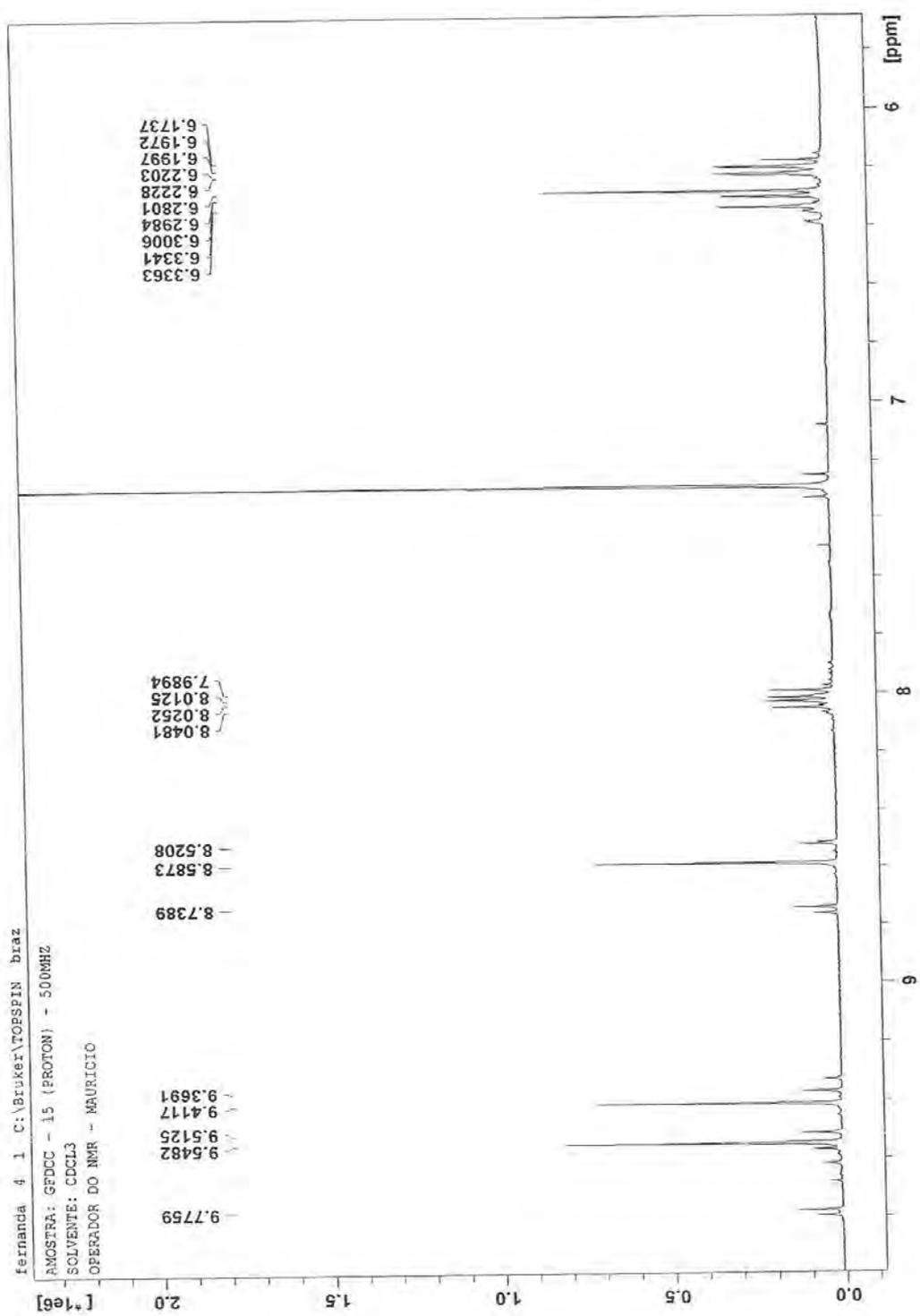


Figura 6: Expansão 1 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de GFDC-15.

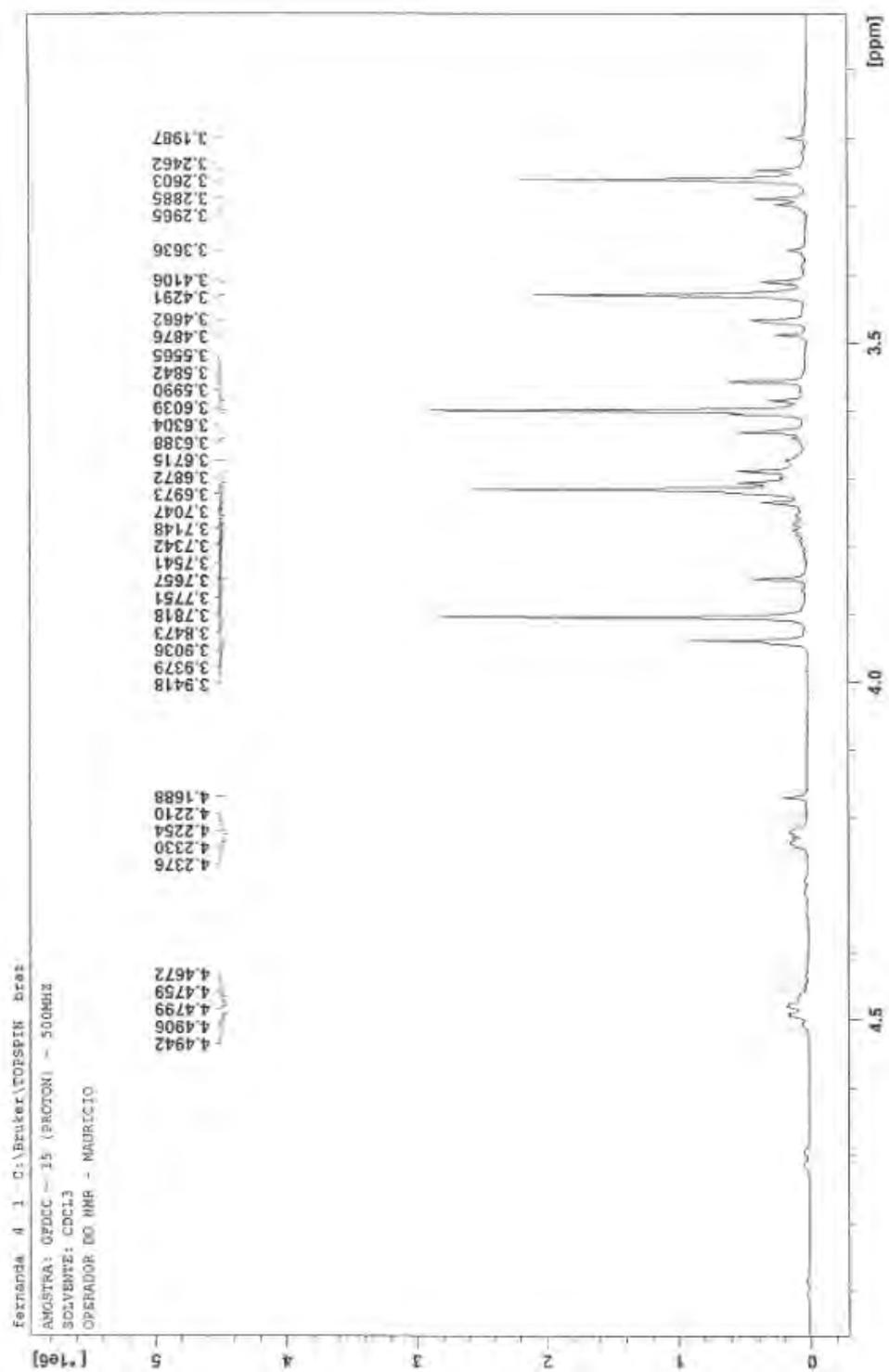


Figura 7: Expansão 2 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de GFDC-15.

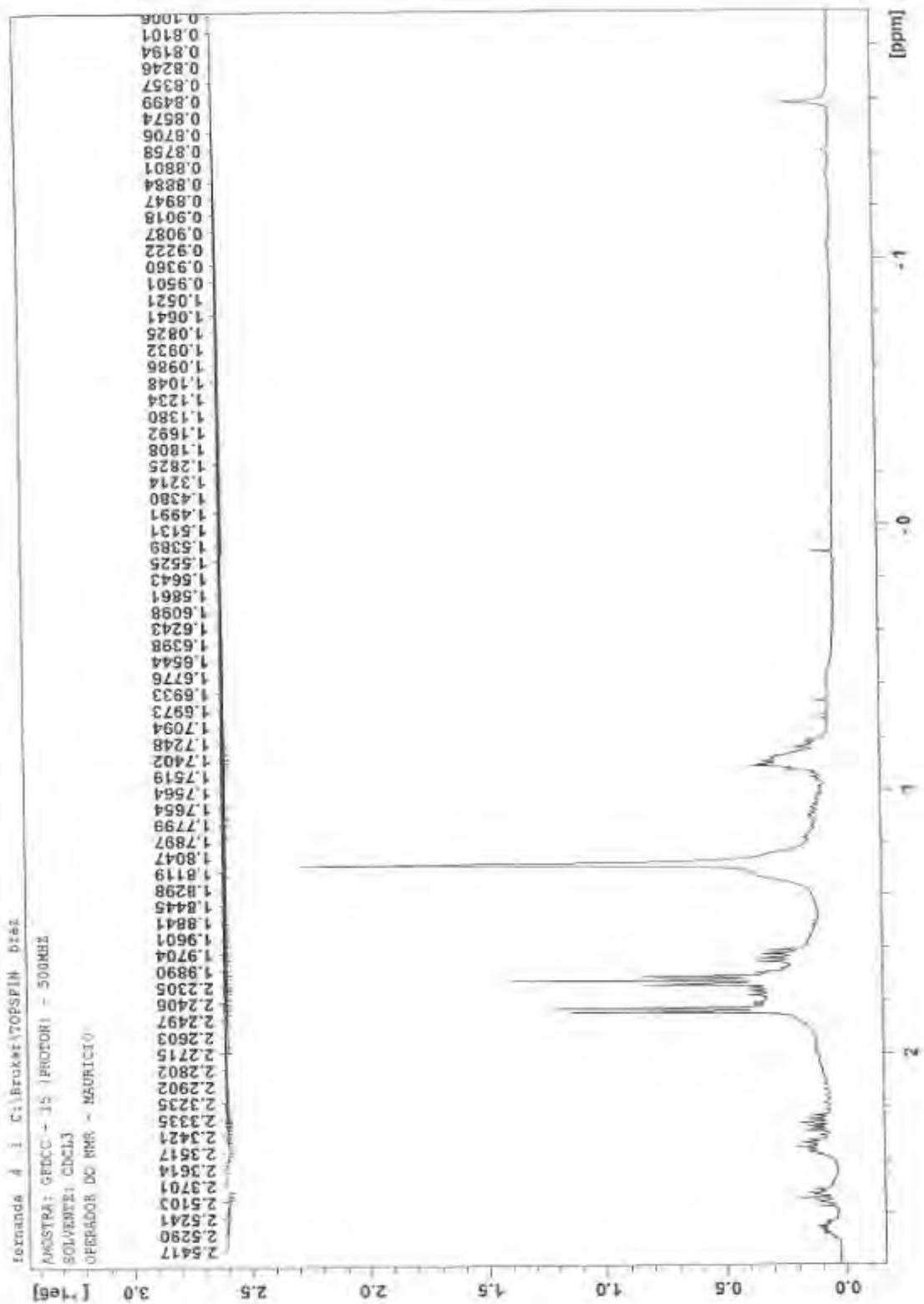


Figura 8: Expansão 3 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de GFDC-15.

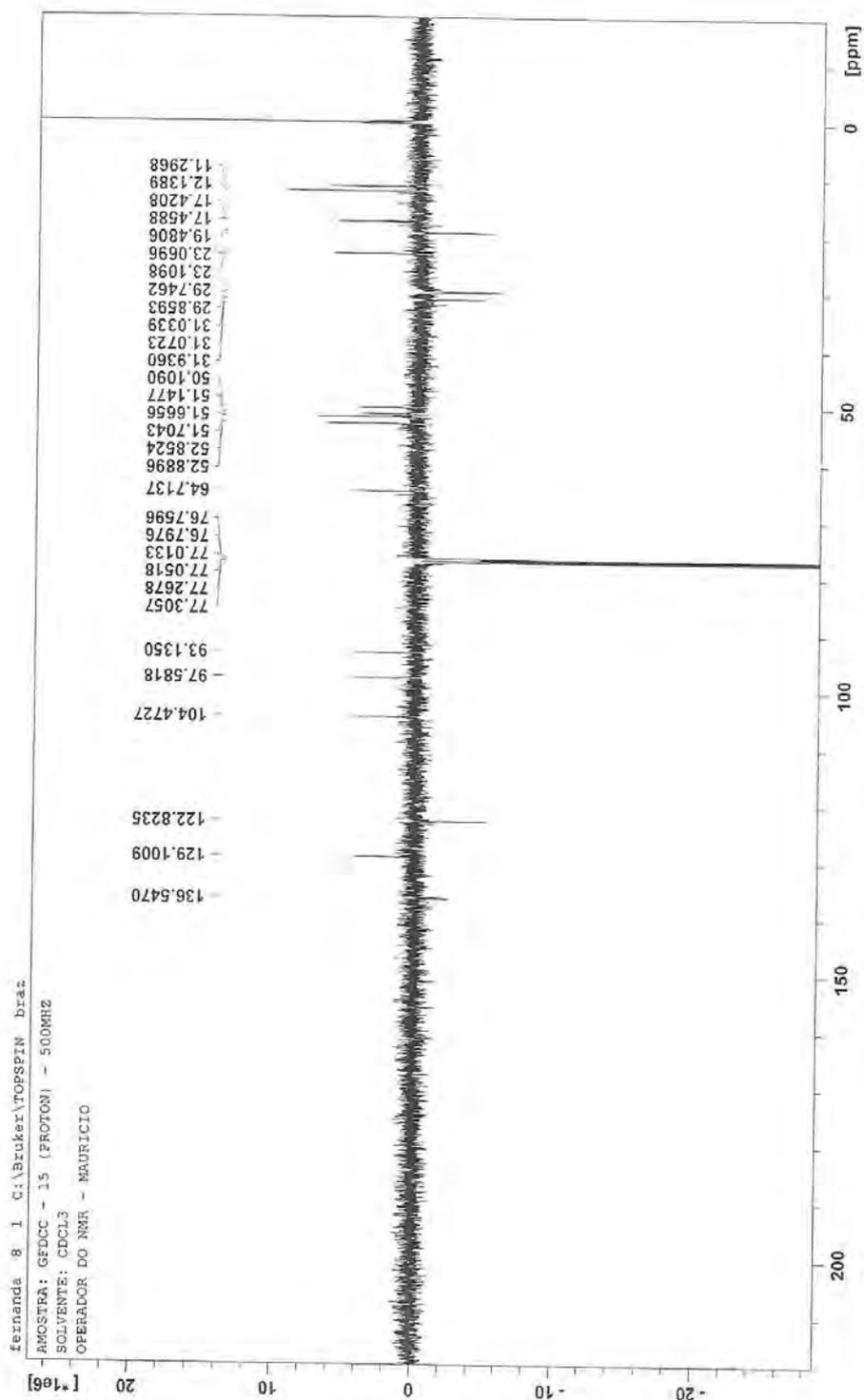


Figura 9: Espectro de RMN ^{13}C - APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de GFDCC-15.

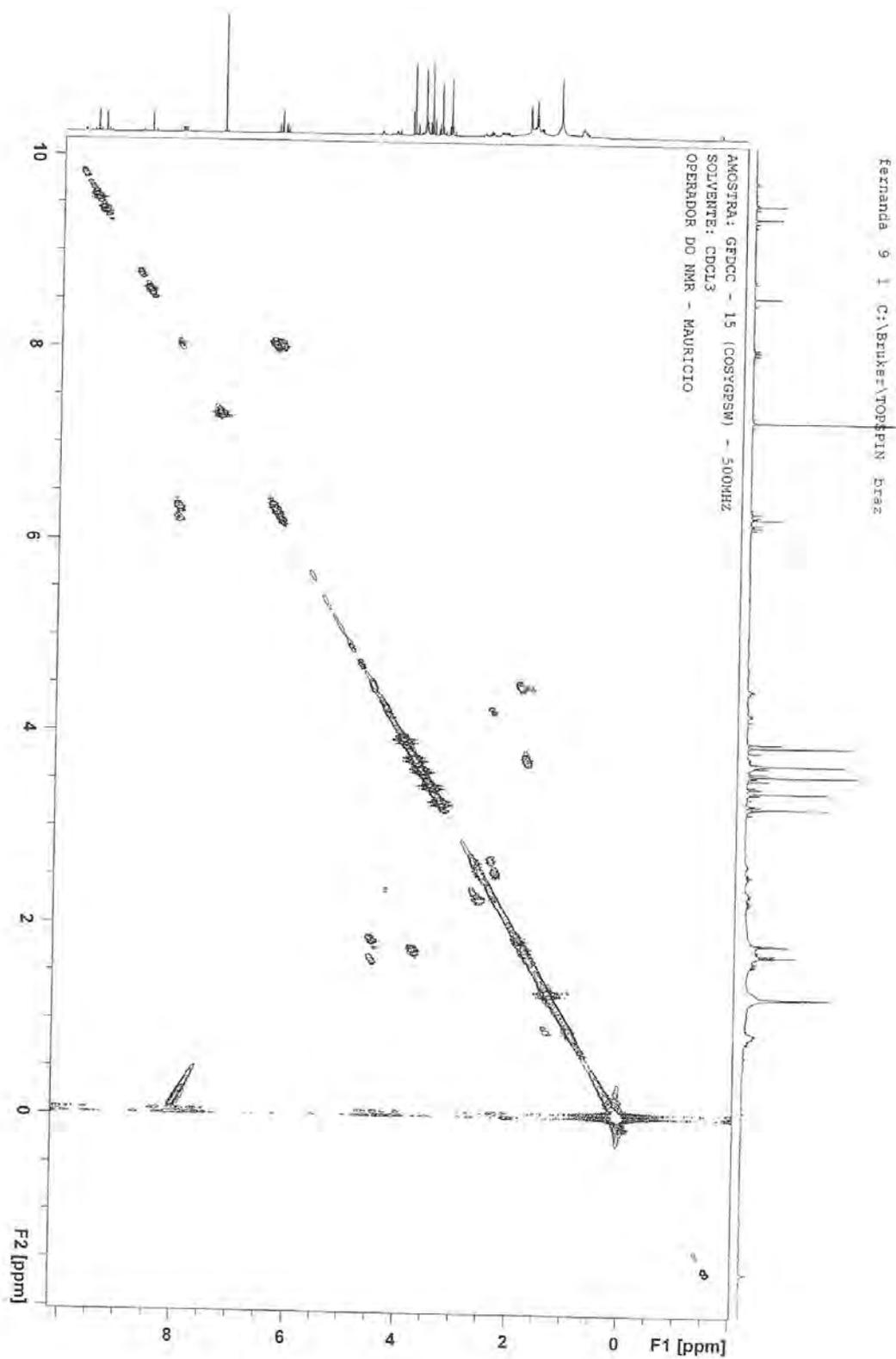


Figura 10: Mapa de correlação ^1H - ^1H -COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de GFDCC-15.

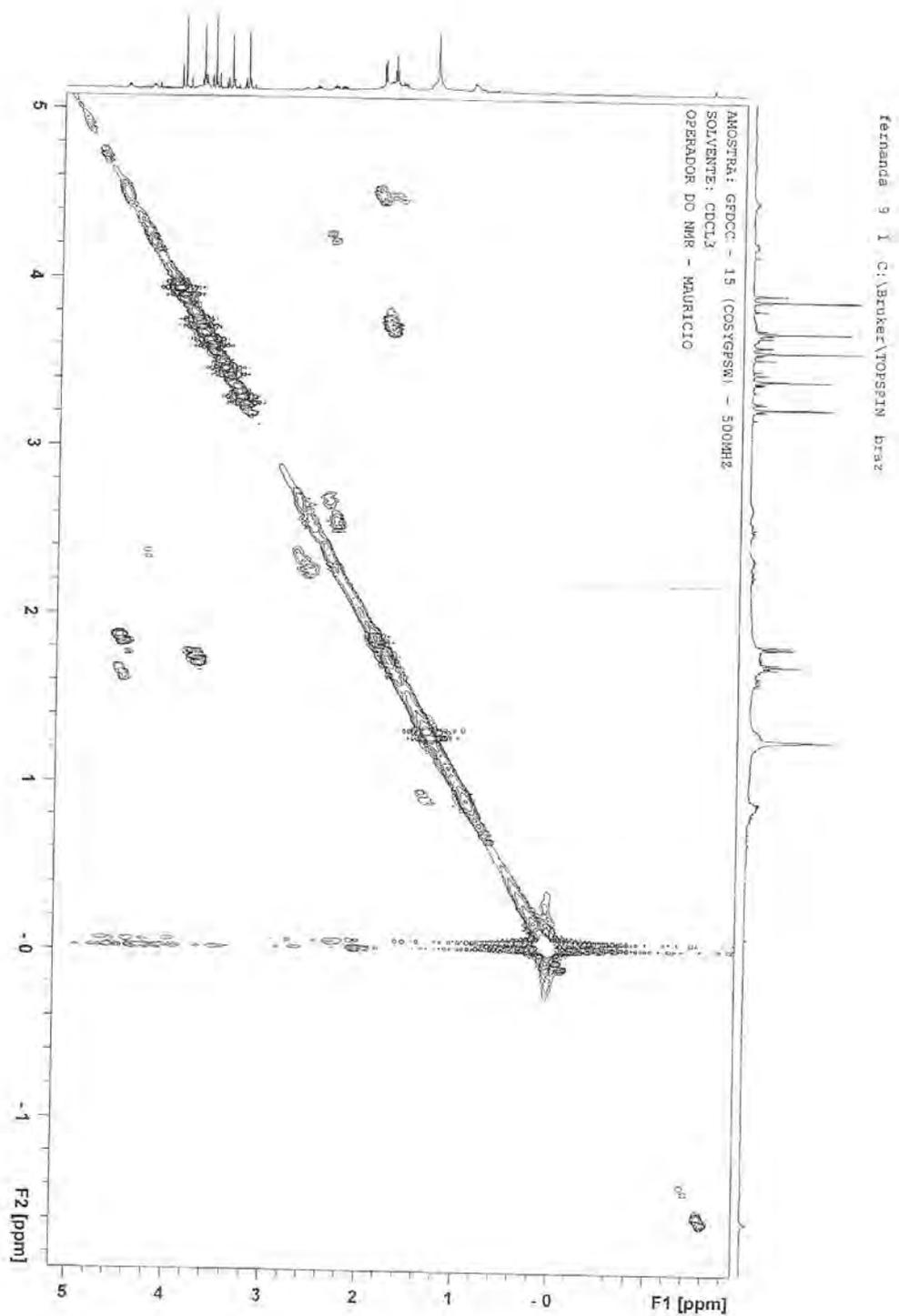


Figura 11: Expansão 1 do mapa de correlação ^1H - ^1H -COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de GFDCC-15.

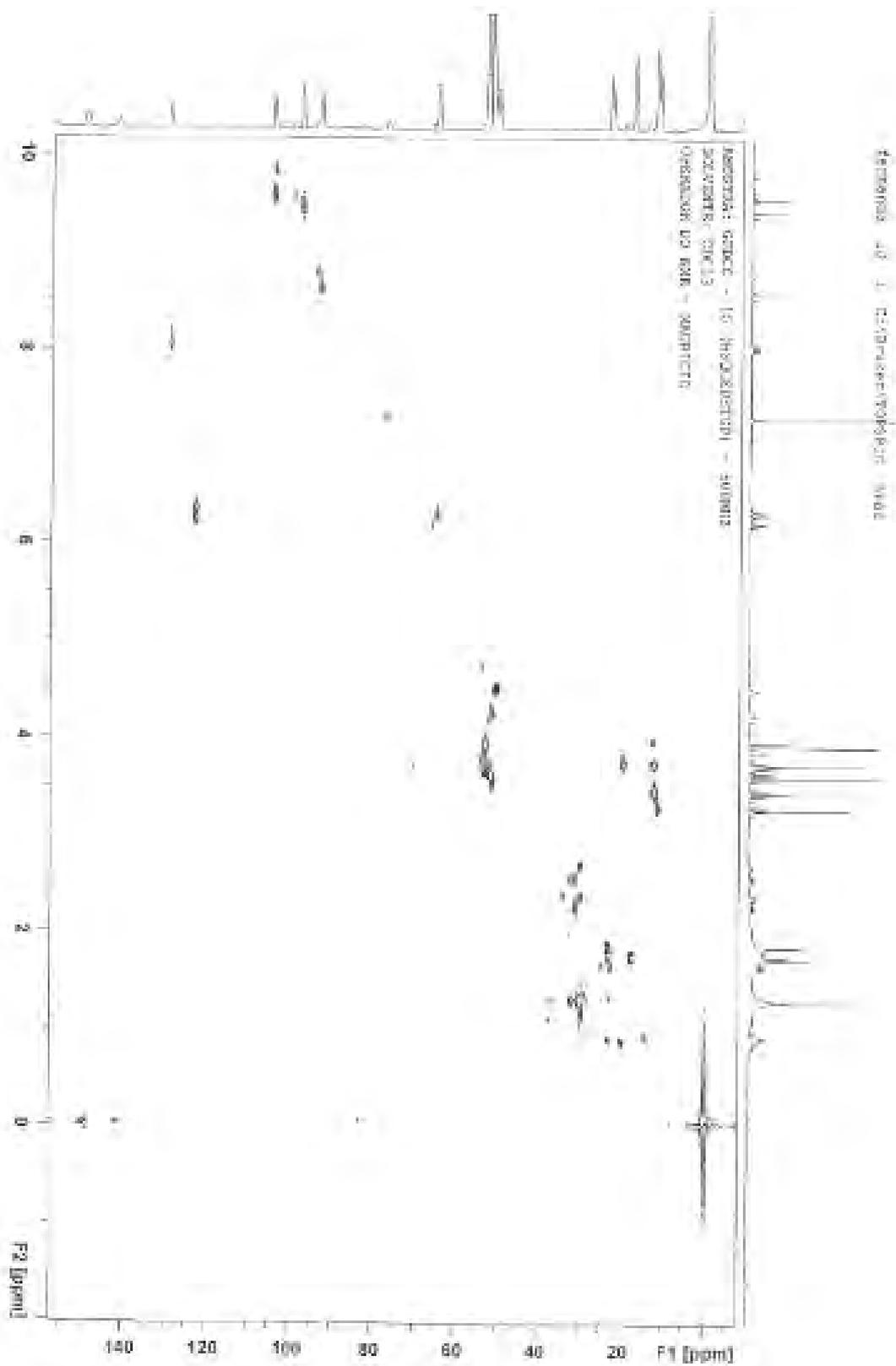


Figura 12: Mapa de correlação do espectro de HSQC (CDCl_3 , 500 MHz) de GFDCC-15.

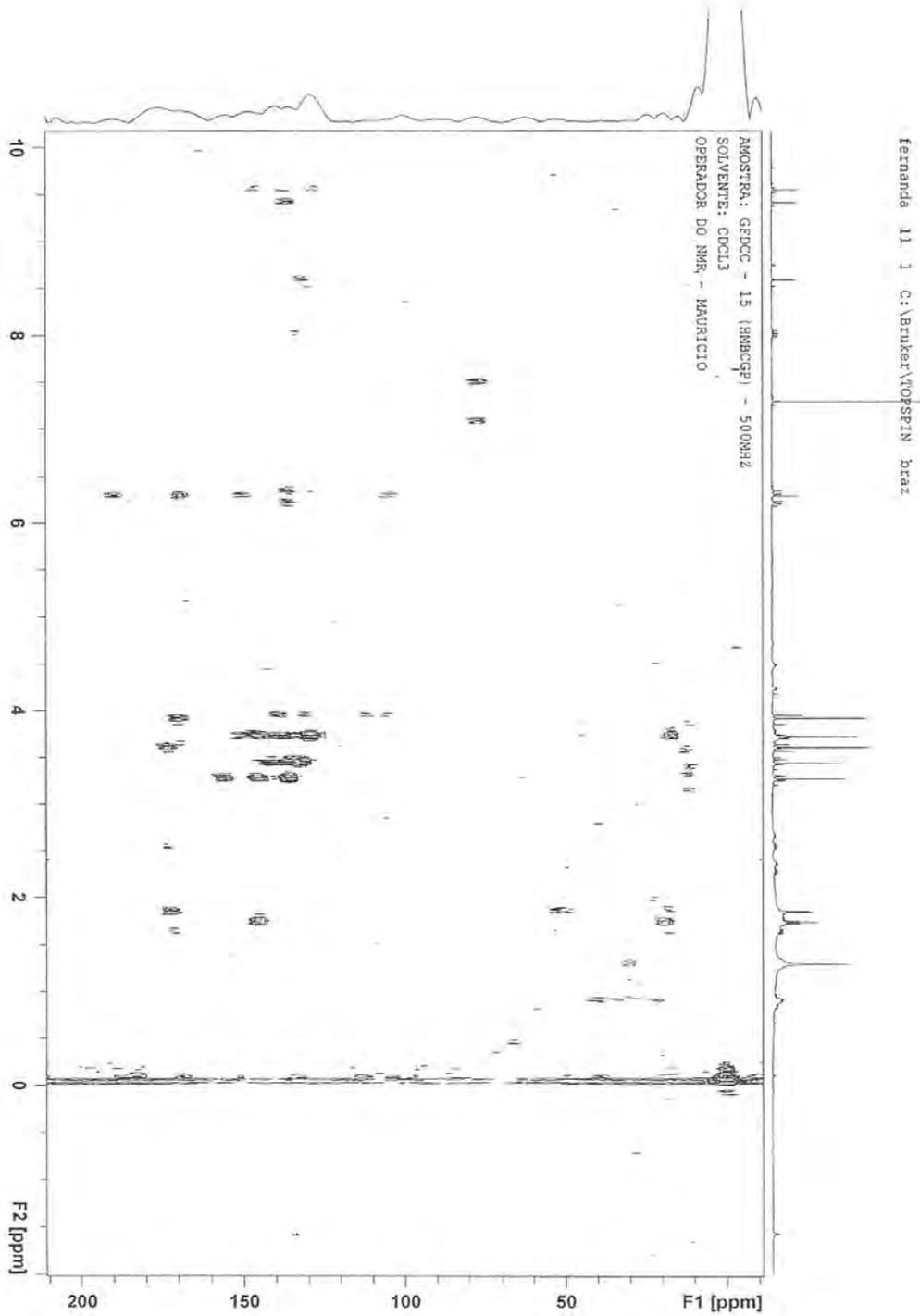
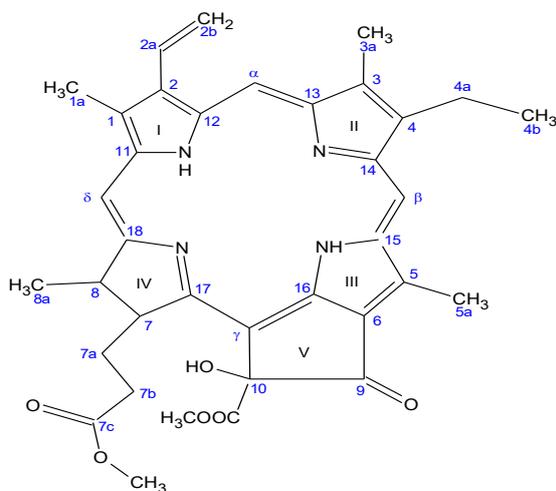


Figura 13: Mapa de correlação do espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 MHz) de GFDCC-15.

4.1.2 Caracterização da substância GFH 12.6



GFH 12.6

A substância codificada como GFH12.6 também apresentou-se como um sólido amorfo verde escuro e mostrou um espectro apresentando sinais próximos aos da GFDCC 15. Assim, o espectro de RMN ^1H (fig 14, pág. 54) de GFH12.6 exibiu absorções que também corroboram a sugestão que a substância em análise apresenta um núcleo porfirínico. Esta sugestão foi fortalecida ao observar sinais para quatro metilas de anéis pirrólicos em 3,34 (Me-1a); 3,17 (Me-3a); 3,70 (Me-5a) e 1,61 (Me-8a), sendo condizentes com os anéis I, II, III e IV, respectivamente (tabela 13, pág. 53). O sinal em δ 3,17 permitiu propor que esta substância trata-se do feoforbídeo a.

Ainda foi observado no espectro de RMN ^1H , sinais para um grupo de hidrogênios alílicos em δ_{H} 3,40 (s), 3,20 (s) e 3,75 (s), para um grupo de hidrogênios vinílicos em δ_{H} 8,05 (dd), 6,25 Ha e 6,25 Hb. Além disso, os sinais referentes aos hidrogênios oleofínicos H- α (9,48s), H- β (9,62s) e H- δ (8,65s) condizente com o núcleo porfirínico do feoforbídeo a (SIANNE et al., 1998; Jerz *et al.*, 2007) podem ser observados (tabela 13, pág 53). Um simpleto largo em δ 3,65 (H-7d), com integração para os três hidrogênios, caracteriza o grupo metoxila e um tripleto em δ 1,72 com $J=5,0$ Hz condiz com hidrogênios do grupo CH_3 (posição C-4b), como pode ser visto na tabela 13, pág. 53.

Os espectros de correlação bidimensional heteronuclear a duas ($^2J_{\text{CH}}$) e a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) HMBC, mostraram correlações semelhantes à GFDCC 15, tais como

entre os hidrogênios 2bHb em δ_H 6,25 e 2bHa em δ_H 6,25 com o carbono C-2 em δ_C 136,8 e com H-2a em δ_C 129,1 como também entre H-2a em δ_H 8,05 com C-1 em δ_C 132,0, com H-2b (δ_C 123,9) e com H-2 em δ_C 136,8. Outra correlação $^3J_{CH}$ acontece entre os hidrogênios H-4b em δ_H 1,72 com C-4 (δ_C 145,0) e C-4a (δ_C 19,4). Estas correlações corroboram as posições 2 e 4 para os grupos vinílico e etílico, respectivamente.

Além disso, as confirmações referentes aos hidrogênios olefínicos e grupos metila foram atribuídas através do HMBC pelas respectivas correlações: H- β (δ_H 9,62) com C-5 (δ_C 129,4), com C-15 (δ_C 136,0), com C-4 (δ_C 145,0) e com C-14 (δ_C 151,0); H- α (δ_H 9,48) com C-2 e 12 (δ_C 136,8) e com C-3 (δ_C 136,3); H- δ C-4 (δ_H 8,65) com C-1 (δ_C 132,0), com C-8 (δ_C 50,3), com C-11 (δ_C 143,0) e com C-18 (δ_C 173,0); Me-1a (δ_H 3,34) com C-11 (δ_C 143,0), com C-2 (δ_C 136,8) e com C-1 (δ_C 132,0); Me-3a (δ_H 3,17) com C-13 (δ_C 155,0), com C-4 (δ_C 145,0) e com C-3 (δ_C 136,0); Me-5a (δ_H 3,70) com C-5 e C-6 (δ_C 129,0) e com C-15 (137,0); Me-8a (δ_H 1,61) com C-18 (δ_C 173,0) e com C-8 (δ_C 50,3).

Numa análise comparativa entre os dados espectrais de GFDCC15 e de GFH 12.6, foi possível observar nesta última a ausência de um simpleto em δ_H 6,28 atribuído ao H-10 da estrutura GFDCC15. Este fato, aliado ao surgimento do sinal de carbono não hidrogenado ligado a oxigênio em δ_C 89,2, mais a comparação com os dados da literatura (MATSUO *et al.*, 1996; CHEE *et al.*, 2005), permitiram sugerir a que a substância em análise possui um grupo hidroxila em sua molécula, na posição 10 (tabela 13, pág. 53) e trata-se da **7c-metoxi-10-hidroxifeoforbídeo a**, descrita pela primeira vez na família na espécie em estudo.

Tabela 13: Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da porfirina **GFH 12-6**, em CDCl_3 , as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC e comparação com valores de referência do modelo **Mo-2** (éster etílico do 10-hidrofeoforbideo A) (MATSUO *et al.*, 1996; CHEE *et al.*, 2005).

N° C	HMQC ($^1J_{\text{CH}}$)		HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$)	Mo-2	
	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)		^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
1	-	132,0	-	-	131,8
2	-	136,8	-	-	136,5
3	-	136,8	-	-	136,1
4	-	145,0	-	-	145,2
5	-	129,4	-	-	129,4
6	-	126,0	-	-	127,0
7	4,15 <i>m</i>	51,8	31,0 (7a); 22,7 (8a); 162,0 (17) e 173,0 (18)	4,17	51,8
8	4,50 <i>m</i>	50,3	31,0 (7a); 51,8 (7); 22,7 (8a); 162,0 (17) e 173,0 (18)	4,52	50,3
9	-	192,0	-	-	192,3
10	-	89,2	-	-	89,0
11	-	143,0	-	-	142,8
12	-	136,3	-	-	136,2
13	-	155,0	-	-	155,5
14	-	151,0	-	-	151,0
15	-	138,0	-	-	137,9
16	-	150,0	-	-	149,8
17	-	162,0	-	-	162,5
18	-	173,0	-	-	172,4
α	9,48 <i>s</i>	98,0	136,3 (3); 136,8 (2) e 136,8 (12)	9,50	97,5
β	9,62 <i>s</i>	104,3	129,4 (5); 136,0 (15); 145,0 (4) e 151,0 (14)	9,65	104,4
γ	-	107,0	-	-	107,9
δ	8,65 <i>s</i>	93,6	50,3 (8); 132,0 (1); 143,0 (11) e 173,0 (18)	8,67	
1a	3,34 <i>s</i>	12,1	132,0 (4); 143,0 (11) e 136,8 (2)	3,46	12,1
2a	8,05 <i>dd</i> (J= 22 Hz e 14Hz)	129,1	123,9 (2b); 132,0 (1) e 136,8 (2)	8,06	129,0
2b	6,25Ha <i>d</i> (J=22Hz) e 6,25Hb <i>d</i> (J= 14Hz)	123,9	129,1 (2a) e 136,8 (2)	6,34 e 6,23	122,8
3a	3,17 <i>s</i>	11,3	155,0 (13); 136,3 (3); 145,0 (4) e 151,0 (14)	3,30	11,2
4a	3,57 e 3,65 <i>m</i>	19,5	136,3 (3); 145,0 (4); 151,0 (14) e 17,5 (4b)	3,75	19,7
4b	1,72 <i>t</i> (J= 5Hz)	17,5	19,4 (4a) e 145,0 (4)	1,75	16,3
5a	3,70 <i>s</i>	12,4	138,0 (15); 126,0 (6); 129,4(5)	3,64	12,2
7a	2,30 e 2,05 <i>m</i>	31,0	175,0 (7c); 51,8 (7); 31,4 (7b)	2,26 e 2,31	31,1
8a	1,61 <i>d</i> (J= 10Hz)	22,7	50,3 (8) e 173,0 (18)	1,71	22,7
7b	2,6 e 2,9 <i>m</i>	31,4	175,0 (7c); 51,8 (7); 31,0 (7a) e 162,0 (17)	2,05 e 2,09	31,6
7c	-	175,0	-	-	173,6
7d	3,65 <i>s</i>	53,5	175,0 (7C)	4,06	60,8
7e	-	-	-	1,10	14,4
10a	-	173,5	-	-	172,8
10b	3,61 <i>s</i>	51,7	173,5 (P1)	3,77	53,4
OH	5,53	-	-	5,54	-

GFH12-6 - Alan
Op. Rafaela

```

NAME          PRUG310268
EXPERNO      16
PROCNO       1
Date_        20130314
Time         16.55
INSTRUM      SPECT
PROBHD       5 mm BBO BB-JR
PULPROG      zgpg30
PC           400132
SOLVENT      CDCl3
MSLVENT      1.6384
DS           4
SWH          30030.029 Hz
AQ           0.45622 Hz
FIDRES       1.091240 sec
RG           20642.5
WV          16.650 usec
TE           299.0 K
CNS12        145.000000
D1           2.0000000 sec
D2           0.0034828 sec
D12          0.00002000 sec
TD0          1
===== CHANNEL F1 =====
NUCL         13C
P1           6.50 usec
P2           13.00 usec
PL1          -2.00 dB
PL2          151.28073120 W
SFO1         125.7703643 MHz
===== CHANNEL F2 =====
C1P1PRG2    maltz16
RG22        1H
P3           12.00 usec
P4           24.00 usec
PCPR2       100.00 usec
PL3         12.00 dB
PL4         12.00 dB
PL5         17.54155340 W
PL6         0.25238761 W
SFO2         500.1320035 MHz
SI          32768
SF          125.7577890 MHz
EM          0
SSS         1.00 Hz
LB          0
GB          0
PC          1.40
  
```

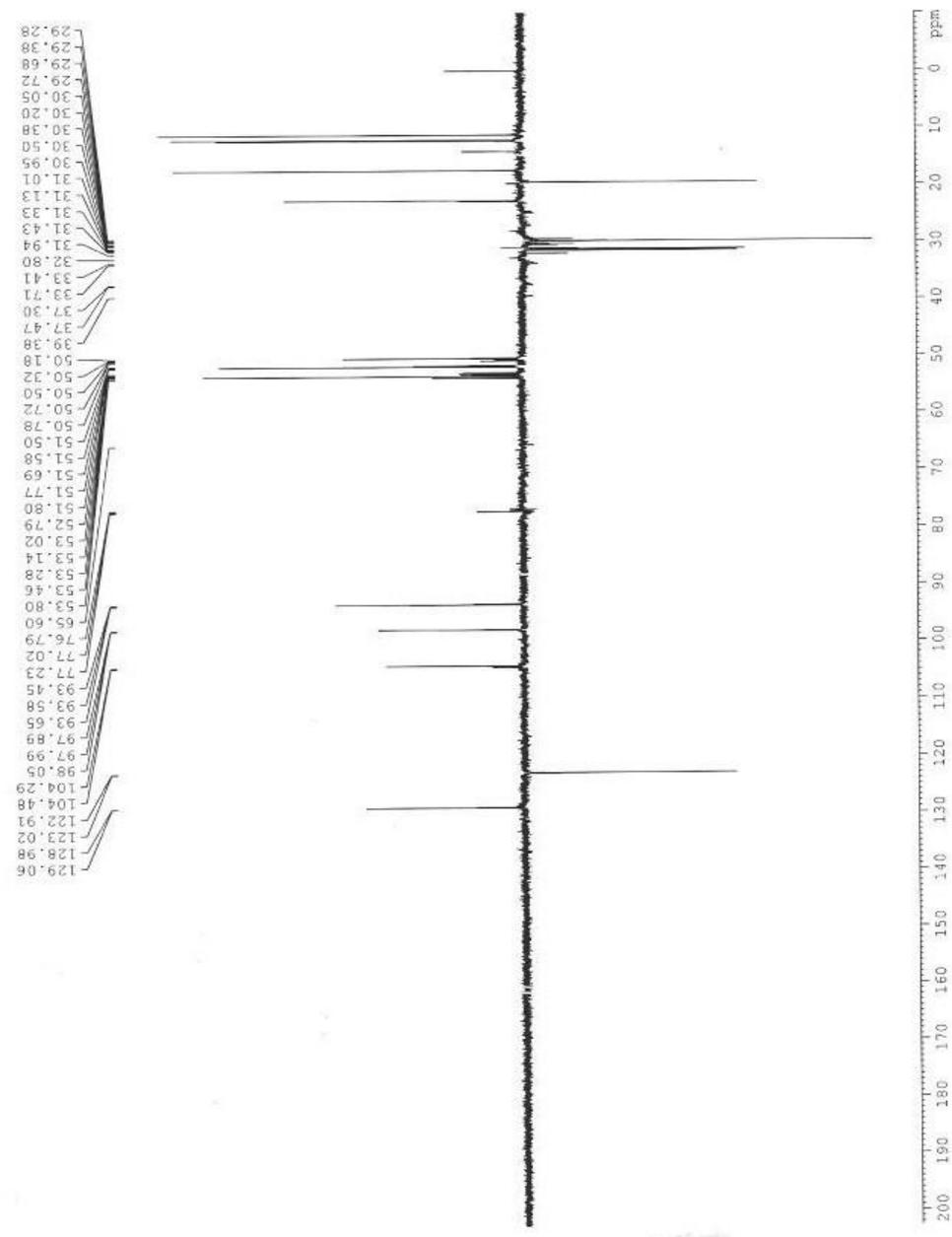


Figura 14: Espectro de RMN ¹³C – DEPT (δ, CDCl₃, 125 MHz) de GFH12.6.

GFH12-6 - Alan
Op. Rafaela

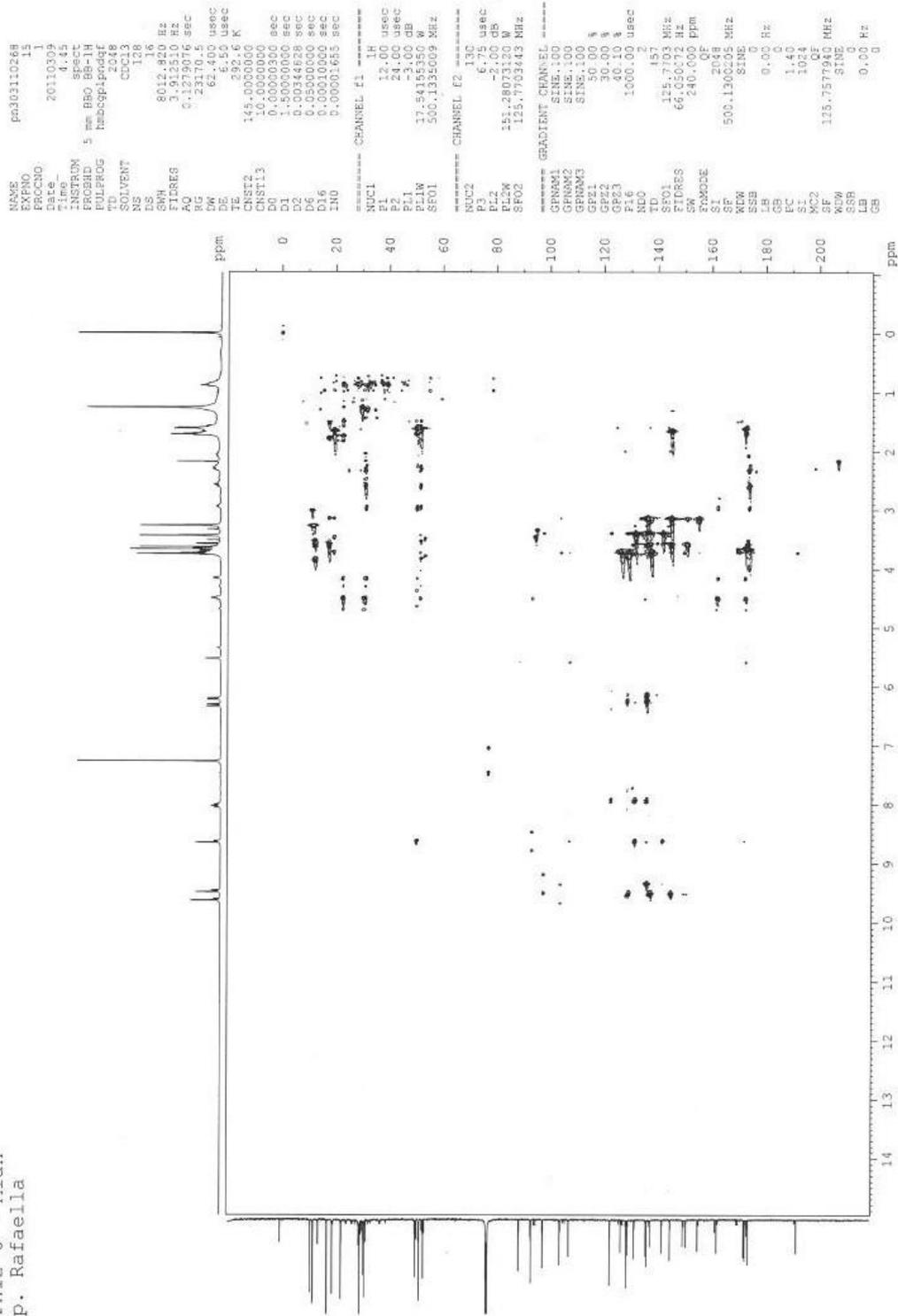


Figura 15: Espectro de HMBC (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de GFH12.6.

GFH12-6 - Alan
Op. Rafaela

```

nm303:10266
NAME
PROCNO 11
Date_ 20110306
Time_ 7.19
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBO BB-1H
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 128
DS 4
SWH 6012.870 Hz
AQ 0.579827 Hz
RG 0.5112832 sec
DE 114
DM 62.400 usec
TE 291.2 K
DO 0.00000300 sec
D1 1.4669199 sec
D12 0.00000400 sec
D16 0.0015000 sec
TR0 0.00012495 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 1H
P0 12.00 usec
P1 12.00 usec
P11 3.00 dB
PL1 17.5415950 N
SFO1 500.1335009 MHz

----- GRADIENT CHANNEL -----
GPM1 SINE 100
P16 1000.00 usec
MDC 1
TD 512
SFO1 500.1335 MHz
FIDRES 15.629172 Hz
SFO 500.1335009 MHz
PC 1.40
SI 1024
SFO 500.1335009 MHz
SFO 500.1335009 MHz
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.40
SI 1024
SFO 500.1335009 MHz
SFO 500.1335009 MHz
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0

```

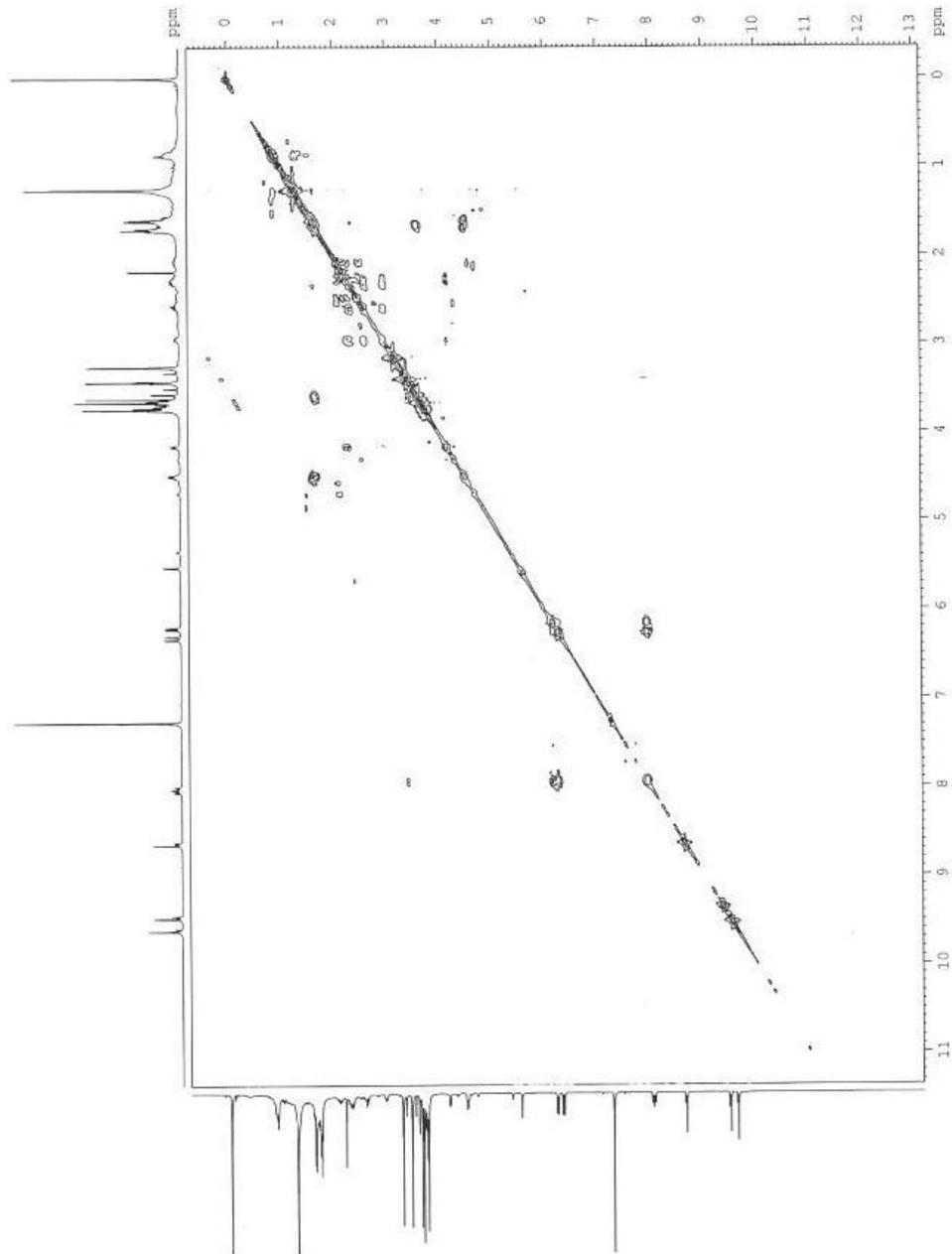
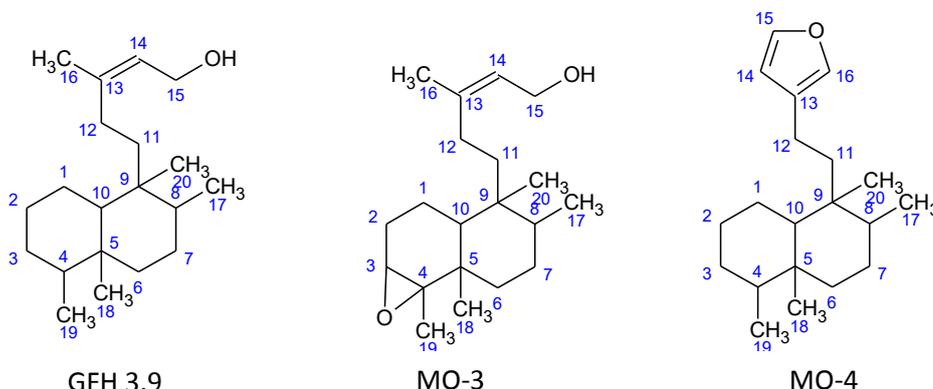


Figura 17: Espectro de COSY (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de GFH12.6.

4.1.3 Caracterização da substância GFH 3.9



A substância GFH 3.9 foi isolada da partição hexânica do extrato em MeOH das folhas. Observou-se no espectro de RMN ^1H (figura 18, pág. 61), os sinais para um grupo de hidrogênios alílicos em δ_{H} 2,00 (m) e 4,20 (d), para um hidrogênio vinílico em δ_{H} 5,43 (t), para um hidrogênio metileno em δ_{H} 1,40 e um tripleto em δ_{H} 1,60 (figura 18, pág. 61) para os hidrogênios do grupo CH_3 (posição C-16) condizentes com a porção alifática do diterpenóide tipo clerodano *ent*-3 β , 4 β -epoxyclerod-13E-em-15-ol (Mo-3) (NAGASHIMA *et al.*, 1995).

O padrão observado no espectro de RMN ^1H permite dizer que a substância GFH 3,9 trata-se de um diterpeno. Isto foi confirmado com a análise do espectro de RMN ^{13}C (figura 19, pág. 62 e tabela 14, pág. 60) da substância GFH 3.9 que permitiu reconhecer a presença de vinte (20) átomos de carbono, sendo cinco carbonos metílicos em δ_{C} 16,2 (Me-16), δ_{C} 22,7 (Me-17), δ_{C} 19,8 (Me-18), δ_{C} 19,7 (Me-19) e δ_{C} 16,2 (Me-20), quatro carbonos metinas em δ_{C} 32,7 (Me-4), δ_{C} 28,0 (Me-8), δ_{C} 32,8 (Me-10) e δ_{C} 123,1 (Me-14), três carbonos quartenários em δ_{C} 37,2 (Me-5), δ_{C} 39,4 (Me-9) e δ_{C} 140,3 (Me-13), além de oito carbonos metilenos em δ_{C} 24,5 (Me-1), δ_{C} 36,7 (Me-2), δ_{C} 37,4 (Me-3), δ_{C} 37,3 (Me-6), δ_{C} 24,8 (Me-7), δ_{C} 25, 1 (Me-11), δ_{C} 39,9 (Me-12) e δ_{C} 59,2 (Me-15).

Dos oito carbonos metilenos descritos acima, um apresentou-se ligado a um átomo de oxigênio δ_{C} 59,2 (4,20 d, $J=15,0$ Hz), indicando a presença de um grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono C-15, que foram confirmadas pelas correlações heteronucleares observadas pelos mapas de correlação HMBC (figura 22, pág. 65) através das correlações $^2J_{\text{CH}}$ entre δ_{H} 4,20 (H-15) com o carbono metino C-14 (δ_{C} 123,1) e com o carbono quartenário C-13 (δ_{C} 140,3).

Os espectros de correlação bidimensional heteronuclear a duas ($^2J_{CH}$) e a três ligações ($^3J_{CH}$) HMBC mostraram correlações entre o hidrogênio H-4 em δ_H 1,35 com o carbono C-3 em δ_C 37,4; entre H-8 em δ_H 1,55 com C-17 em δ_C 22,7 e entre o hidrogênio H-14 em δ_H 5,43 com os carbonos C-16 (δ_C 16,2) e C-12 (δ_C 39,9) confirmando os grupos metinos, como também entre o hidrogênio H-12 em δ_H 2,0 com os carbonos C-11 (δ_C 24,5), C-14 (δ_C 123,1) e C-13 (δ_C 140,3) e entre o hidrogênio H-15 em δ_H 4,20 com C-14 (δ_C 123,1) e C-13 (δ_C 140,3), corroborando com os grupos metilenos.

As confirmações referentes aos grupos metila foram atribuídas através do HMBC pelas respectivas correlações: Me-16 (δ_H 1,60) com C-14 (δ_C 123,1), com C-13 (δ_C 140,3) e com C-12 (δ_C 39,9); Me-17 (δ_H 0,89) com C-8 (δ_C 28,0) e com C-7 (δ_C 24,8); Me-18 (δ_H 0,86) com C-4 (δ_C 32,7); Me-19 (δ_H 0,87) com C-5 (δ_C 37,2) e Me-20 com C-9 (δ_C 39,4).

Os dados de RMN da porção bicíclica da substância GFH 3.9 foi comparada com o derivado metil (+) hardwickiate (Mo-4) (COSTA; FUJIWARA; IMAMURA, 1998). A confirmação da ausência de uma ligação dupla na posição 3, dá-se ao observar um acentuado efeito de blindagem nos C-3 e C-4 com δ_C 37,4 e δ_C 32,7, respectivamente, ao contrário dos carbonos insaturados (sp^2) que apresentam deslocamentos químicos na faixa de 100 a 150 devido o efeito de hibridização que torna-os desblindados (Pavia *et al.*, 2010). Este fato, aliado a comparação com os dados presentes na literatura (NAGASHIMA *et al.*, 1995; COSTA; FUJIWARA; IMAMURA, 1998), permite sugerir que a substância GFH 3,9 trata-se de um novo diterpeno, o **15-hidroxi-13-clerodeno**.

Tabela 14: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e DEPTQ (400 MHz) do diterpeno **GFH 3.9**, em CDCl_3 , as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC, além da comparação com os valores das substâncias referências (NAGASHIMA *et al.*, 1995; COSTA; FUJIWARA; IMAMURA, 1998).

N° C	HSQC ($^1J_{\text{CH}}$)		HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$)	Mo3	Mo4
	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)		^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)
1	1,32 <i>m</i> e 1,19 <i>m</i>	24,5	Não foram observadas correlações	15,7	21,5
2	1,30 <i>m</i>	36,7	Não foram observadas correlações	28,6	27,4
3	1,27 <i>m</i> e 1,09 <i>m</i>	37,4	Não foram observadas correlações	61,8	30,8
4	1,35 <i>m</i>	32,7	37,4 (3)	65,7	46,1
5	-	37,2	-	37,5	37,2
6	1,27 <i>m</i> e 1,09 <i>m</i>	37,3	Não foram observadas correlações	37,4	39,3
7	1,32 <i>m</i>	24,8	Não foram observadas correlações	28,5	27,4
8	1,55 <i>m</i>	28,0	22,7 (17)	36,3	36,6
9	-	39,4	-	39,2	38,5
10	1,39	32,8	Não foram observadas correlações	48,2	49,8
11	1,40 <i>m</i>	25,1	Não foram observadas correlações	37,2	38,8
12	2,00 <i>m</i>	39,9	24,5 (11); 39,9 (12); 123,1 (14) e 140,3 (13)	33,5	18,1
13	-	140,3	-	138,9	125,9
14	5,43 <i>t</i> (J= 15 Hz)	123,1	16,2 (16) e 39,9 (12)	124,6	111,1
15	4,20 <i>d</i> (J= 15 Hz)	59,2	123,1 (14) e 140,3 (13)	59,4	142,6
16	1,60	16,2	123,1 (14); 140,3 (13) e 39,9 (12)	16,4	138,4
17	0,89	22,7	28,0 (8) e 24,8 (7)	16,1	16,2
18	0,86	19,8	32,7 (4)	17,2	13,2
19	0,87	19,7	37,2 (5)	19,9	15,2
20	1,60	16,2	39,4 (9)	18,9	18,2

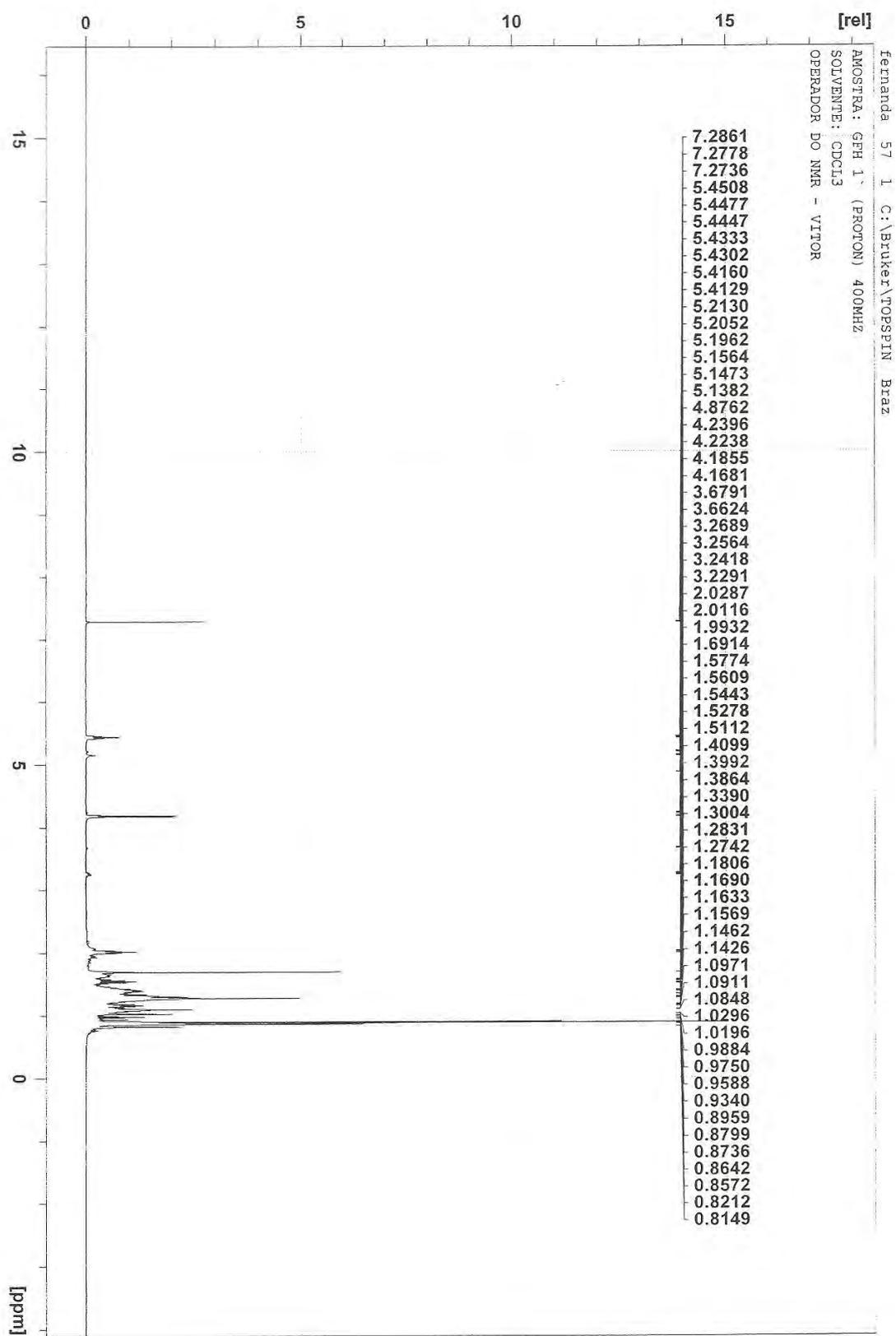


Figura 18: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de GFH 3.9.

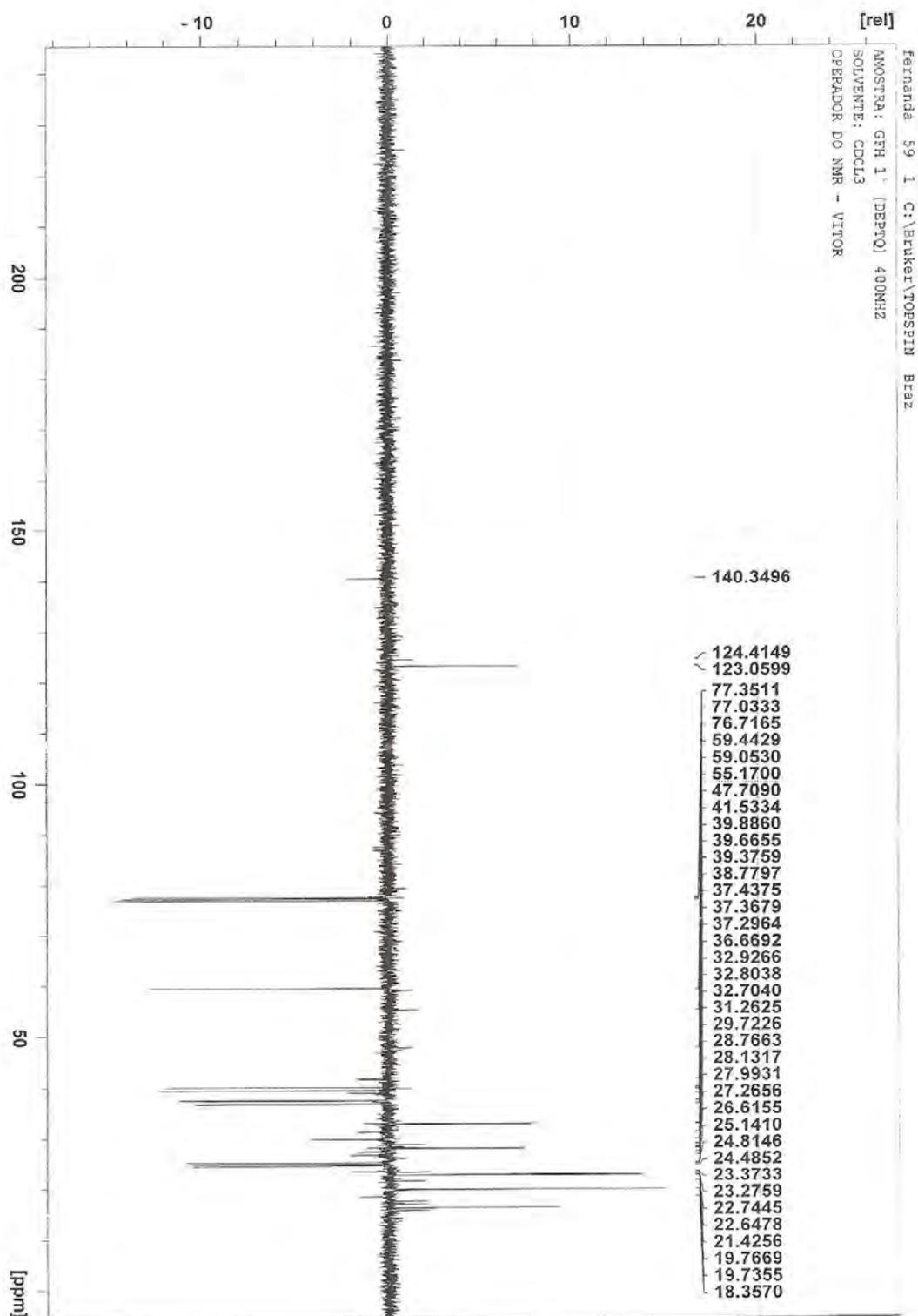


Figura 19: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (CDCl_3 , 400 MHz) de GFH 3.9.

fernanda 58 1 C:\Bruker\TOPSPIN Braz

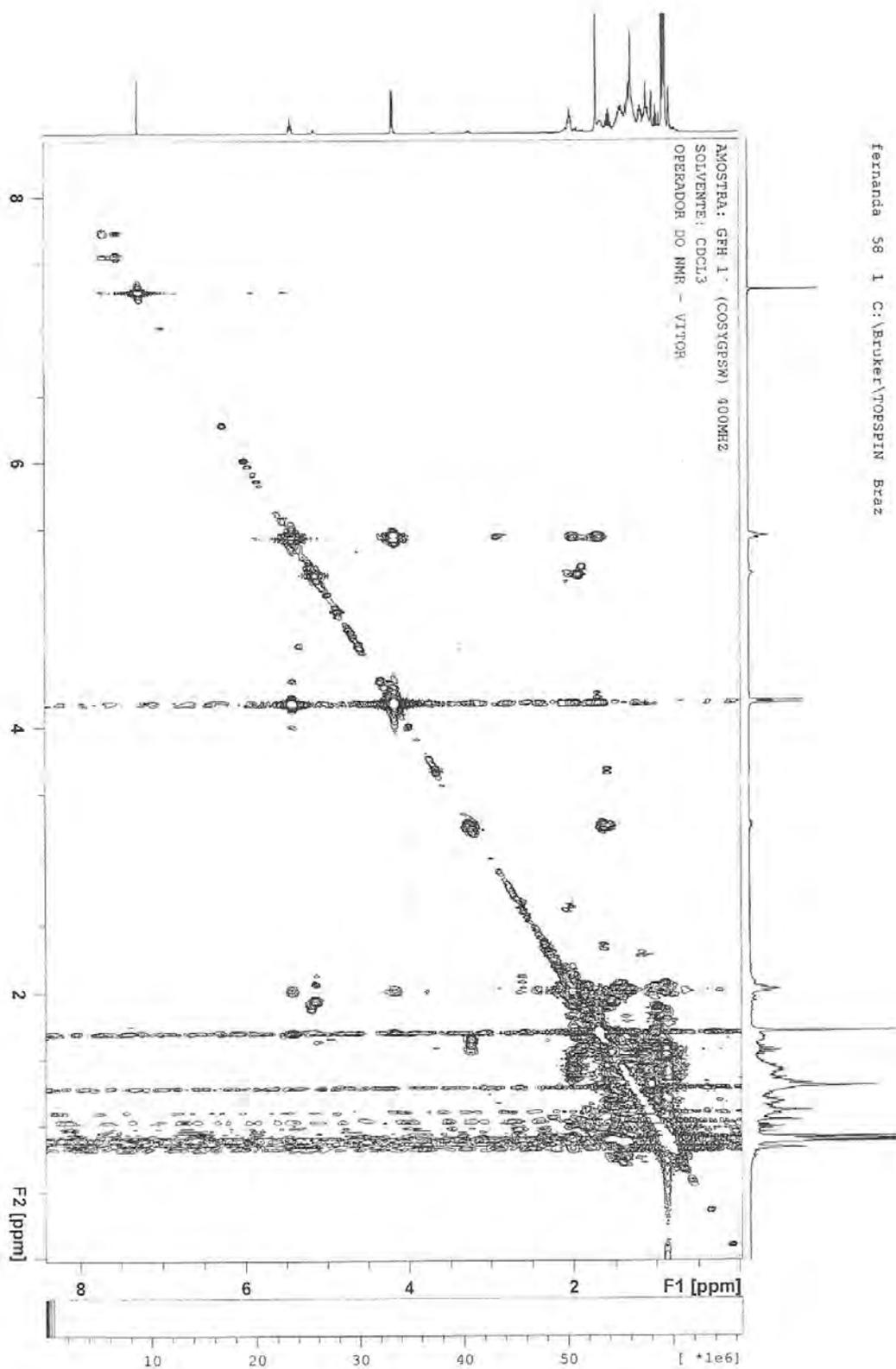


Figura 20: Espectro de ^1H - ^1H - COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de GFH 3.9.

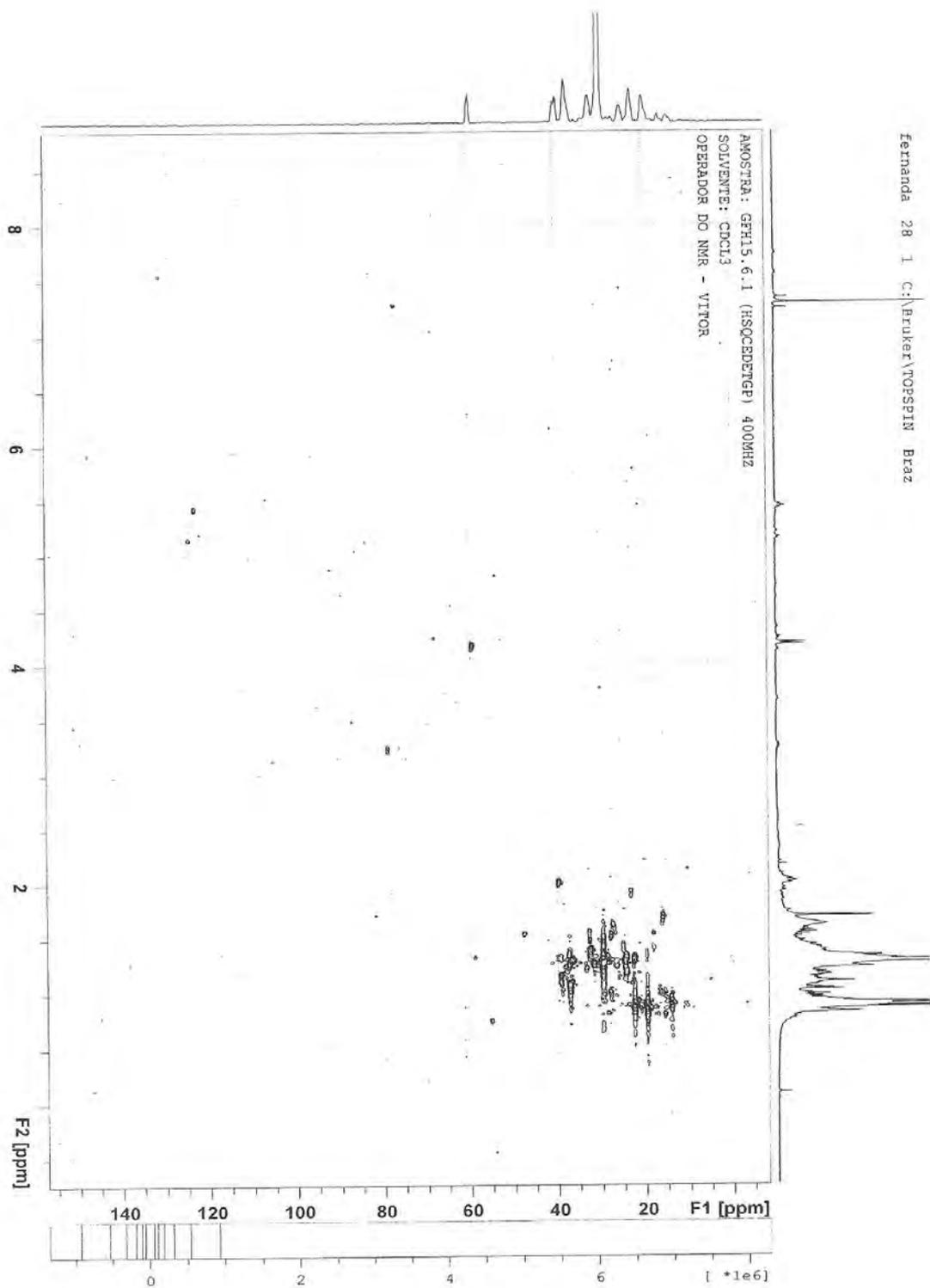


Figura 21: Mapa de correlação do espectro de HSQC (CDCl_3 , 500 MHz) de GFH 3.9.

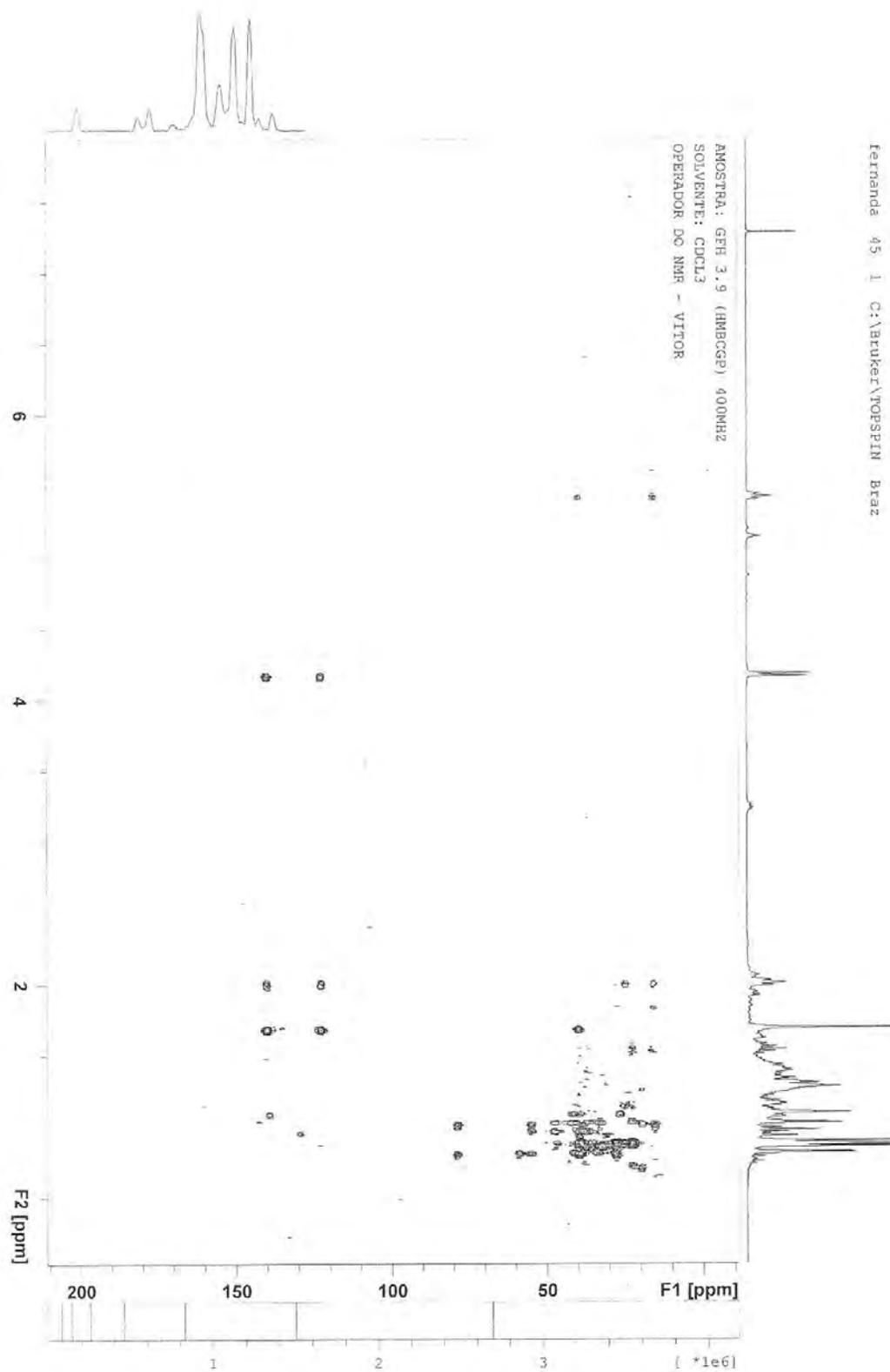
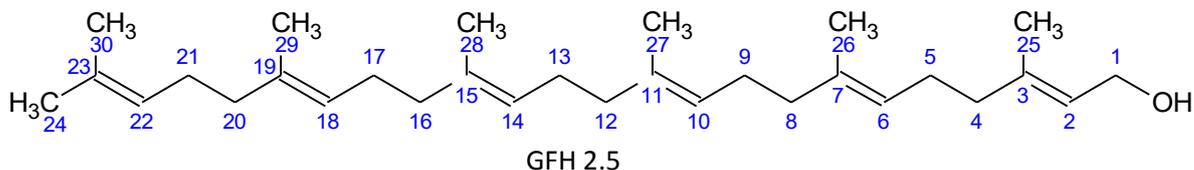


Figura 22: Mapa de correlação do espectro de HMBC (CDCl₃, 400 MHz) de GFH 3.9.

4.1.4 Caracterização da substância GFH 2.5



O espectro de RMN ^1H (figura 23, pág. 68) da substância GFH 2.5 apresentou vinte e quatro sinais, sendo 16 absorções típicas de alcenos: absorções vinila e alílicas. Foram observados seis hidrogênios vinílicos desblindados que confirma a presença de um campo anisotrópico causado pelos elétrons π das ligações duplas, sendo o multiplete com cinco hidrogênios em δ_{H} 5,13 (H-6; H-10; H-14; H-18 e H-22) e um sinal em δ_{H} 5,47 (H-2). Este último apresenta um efeito de desblindagem ainda maior causado também pelo grupo hidroxila, que contém o átomo de oxigênio eletronegativo.

O espectro ainda apresentou absorções referentes aos hidrogênios alílicos em δ_{H} 2,02 (H-4), δ_{H} 2,10 (H-5; H-8; H-13; H-17 e H-21) e δ_{H} 2,05 (H-9; H-12; H-16 e H-20). Foram observados também, sinais separados dos hidrogênios supracitados, localizados em deslocamentos químicos mais baixos (mais blindados), correspondentes aos hidrogênios dos grupos metilas em δ_{H} 1,70 (H-24; H-26; H-29 e H-30) e em δ_{H} 1,57 (H-25; H-27 e H-28) (tabela 15, pág. 67). Estes dados, aliados aos sinais observados no espectro de RMN ^{13}C , foram condizentes com o esqueleto poliprenóide encontrado na literatura (FEITOSA; BEZERRA, 2007).

O espectro apresenta diversas correlações, tais como do hidrogênio H-6 (δ_{H} 5,13) com C-26 (δ_{C} 23,5), com C-5 (δ_{C} 26,1), com C-8 (δ_{C} 32,0) e com C-4 (δ_{C} 39,7), bem como o hidrogênio H-20 (δ_{H} 2,05) com C-21 (δ_{C} 26,8) e com C-19 (δ_{C} 134,9). As demais correlações estão demonstradas na tabela 15, pag 67. De acordo com a análise das absorções observadas nos espectros e a comparação com dados da literatura, permite-nos dizer que o a substância GFH 2.5 trata-se do **hexaprenol**.

Tabela 15: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) do poliprenóide **GFH 2.5 e 2.4**, em CDCl_3 , as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC e comparação com valores de referência do modelo **Mo-5** (FEITOSA; BEZERRA, 2007).

N° C	HSQC ($^1J_{\text{CH}}$)		HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$)	Mo-5 ^{13}C (ppm)
	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)		
1	59,0	4,12 <i>d</i> (J= Hz)	124,1 (2) e 139,9 (3)	58,59
2	124,1	5,47 <i>t</i> (J= Hz)	As correlações não foram observadas	123,84
3	139,9	-	-	139,46
4	39,7	2,02	17,7(25) ; 26,1 (5)	39,31
5	26,1	2,10	39,7 (4) e 124,2 (6)	25,27
6	124,2	5,13 <i>m</i>	23,5 (26); 26,1 (5); 32,0 (8) e 39,7 (4)	123,99
7	136,1	-	-	135,66
8	32,0	2,10	26,4 (9) e 136,1 (7)	25,98
9	26,4	2,05	32,0 (8) e 124,3 (10)	31,57
10	124,3	5,13 <i>m</i>	26,4 (9); 16,0 (27); 32,2(12) e 26,4(9)	124,11
11	135,4	-	-	134,95
12	32,2	2,05	26,4 (13) e 135,4 (11)	31,79
13	26,4	2,10	32,2 (12) e 124,4 (14)	25,89
14	124,4	5,13 <i>m</i>	26,4 (13); 32,2 (12 e 16); 16,0 (28)	124,52
15	135,3	-	-	134,82
16	32,2	2,05	26,7 (17) e 135,5 (15)	31,79
17	26,7	2,10	32,2 (16) e 124,9 (18)	26,26
18	124,9	5,13 <i>m</i>	26,7 (17); 32,2 (16 e 20) e 23,5 (29)	124,60
19	134,9	-	-	134,54
20	32,2	2,05	26,8 (21) e 134,9 (19)	31,79
21	26,8	2,10	32,2 (20) e 124,9 (22)	26,35
22	124,9	5,13 <i>m</i>	26,8 (22); 23,5 (30); 25,7(24) e 32,2 (20)	124,60
23	131,2	-	-	130,82
24	25,7	1,70	26,8 (21); 134,2 (23) e 124,9 (22)	25,27
25	17,7	1,57	39,7 (4); 136,1 (7) e 124,2 (6)	17,26
26	23,5	1,70	32,0 (8); 135,4 (11) e 124,3 (10)	23,02
27	16,0	1,57	32,2 (12); 135,3 (15) e 124,4 (14)	15,58
28	16,0	1,57	32,2 (16); 26,4 (13); 135,5 (15) e 124,4 (14)	15,58
29	23,5	1,70	32,2 (20); 134,9 (19) e 124,9 (18)	15,58
30	23,5	1,70	131,2 (23) e 124,9 (22)	23,02

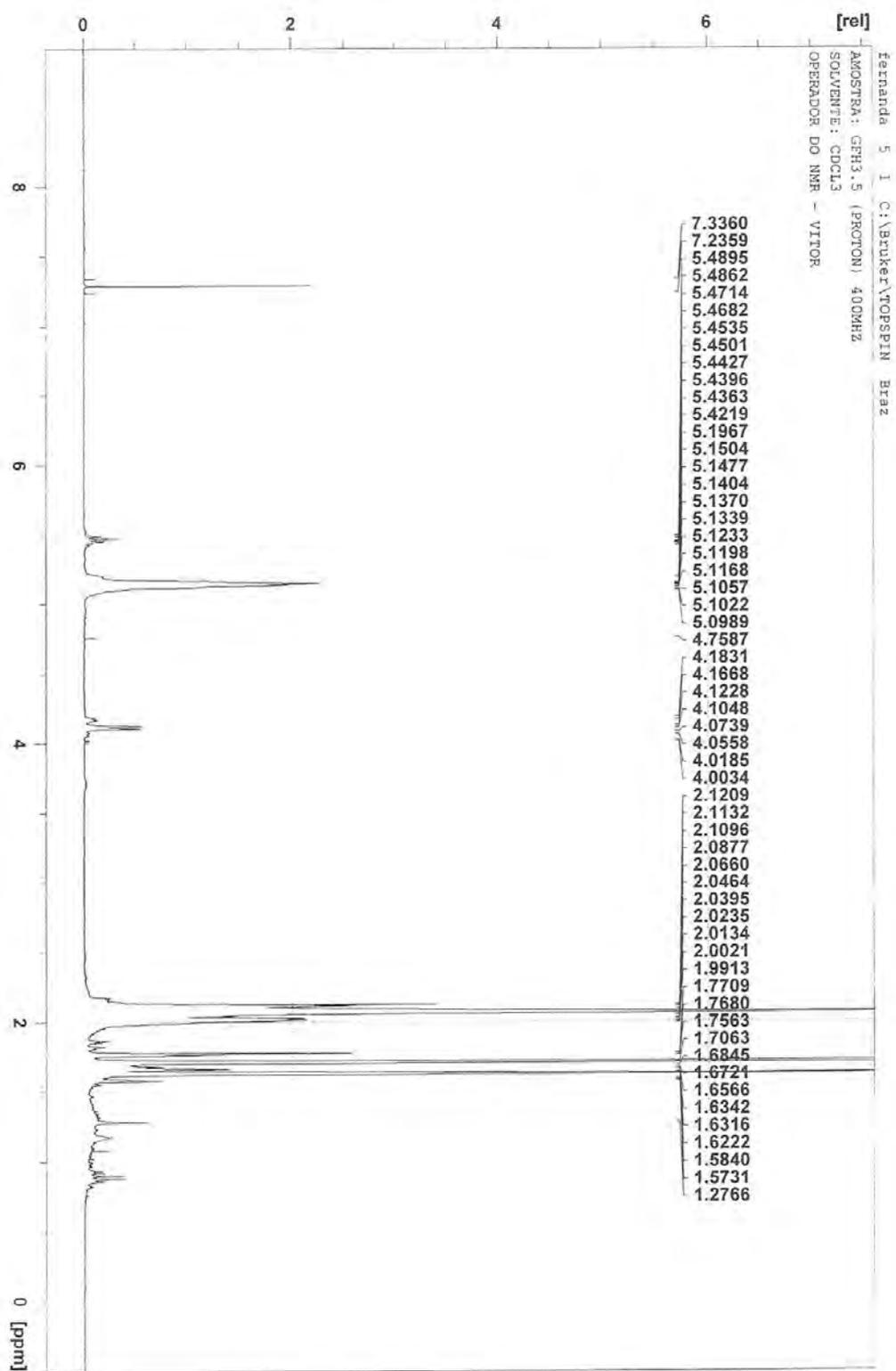


Figura 23: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de GFH 2.5

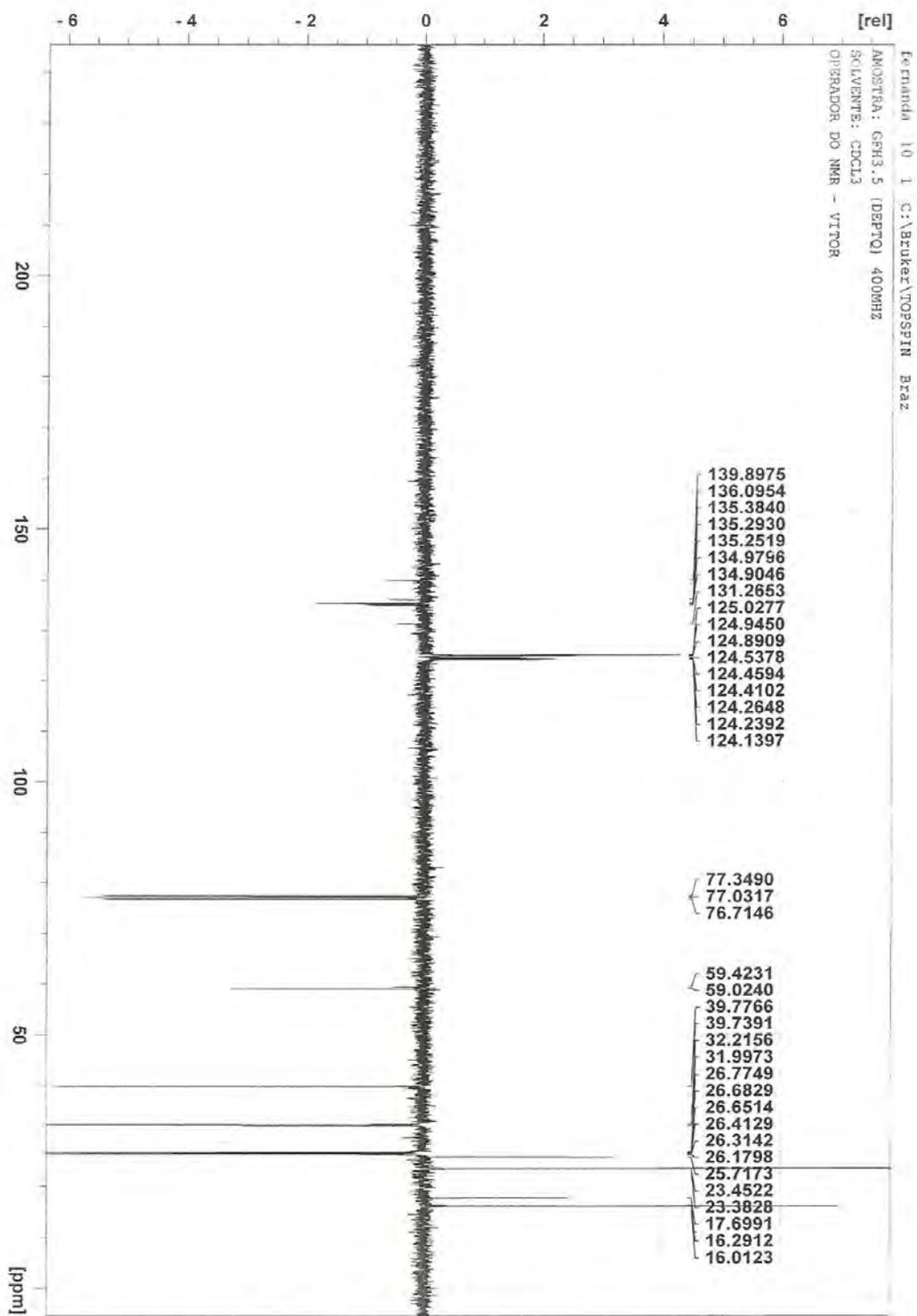


Figura 24: Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) de GFH 2.5.

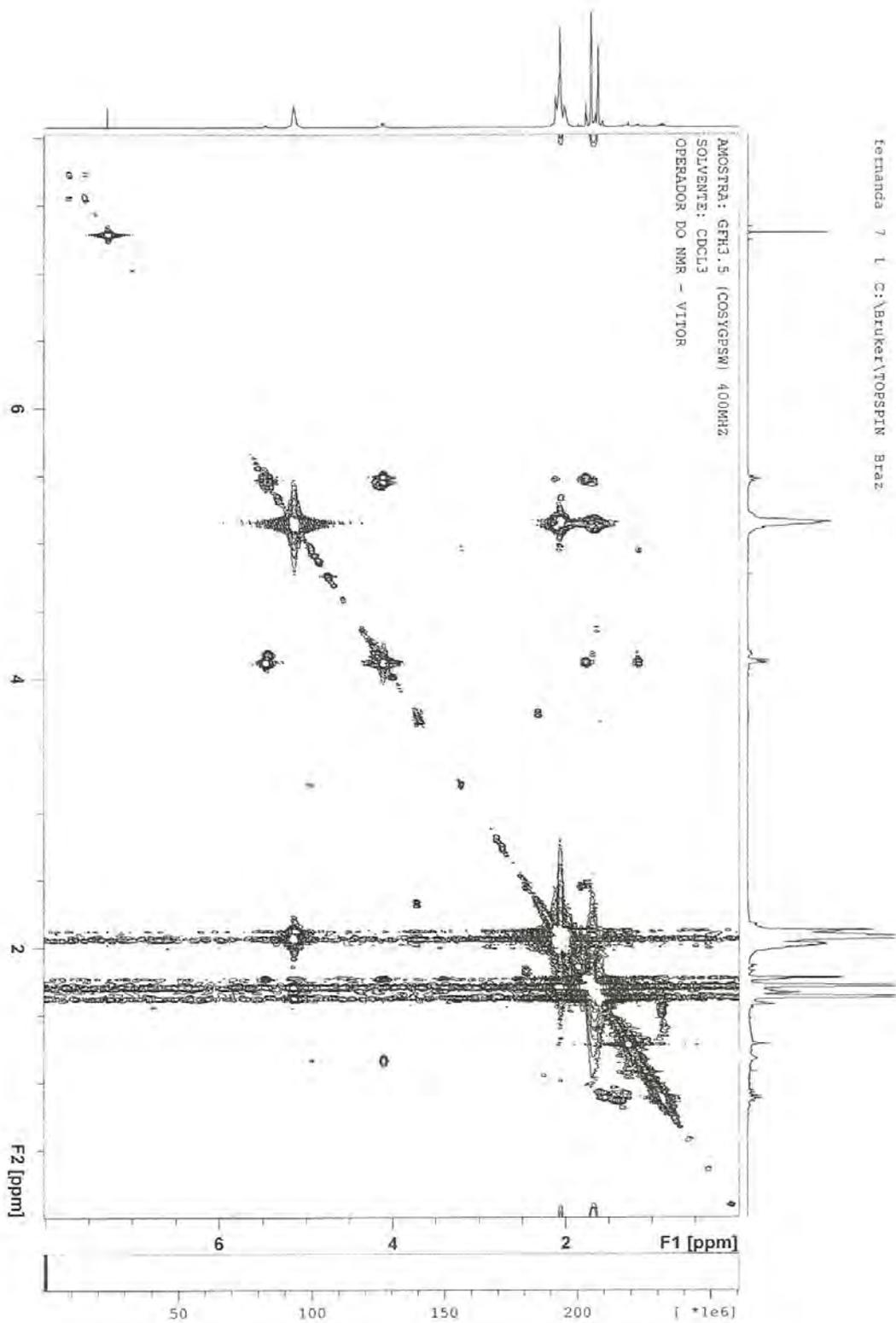


Figura 25: Espectro de ^1H - ^1H - COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de GFH 3.9.

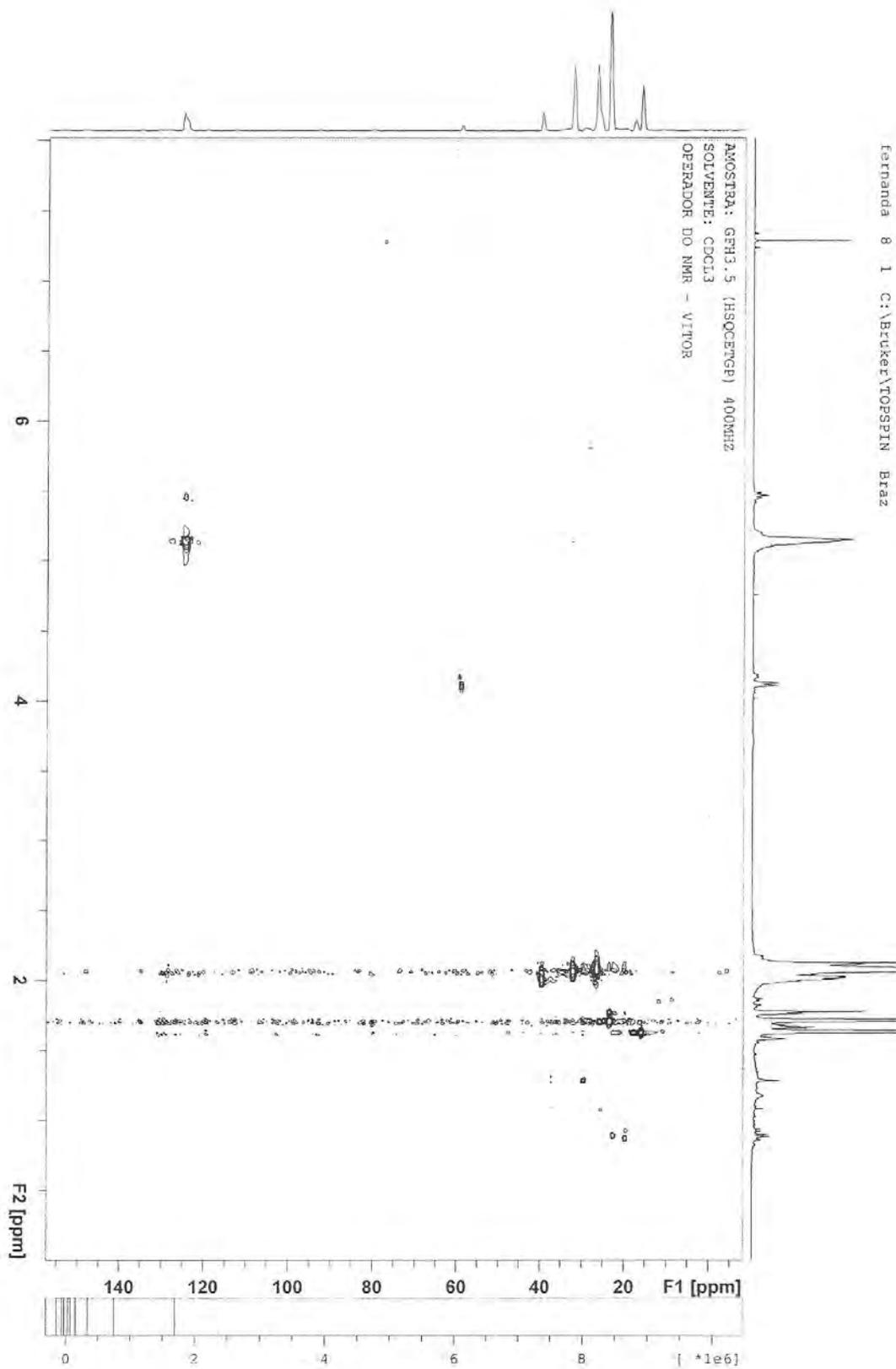


Figura 26: Mapa de correlação do espectro de HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) de GFH 2.5.

Fernanda 9 1 C:\Bruker\TOPSPIN B1a2

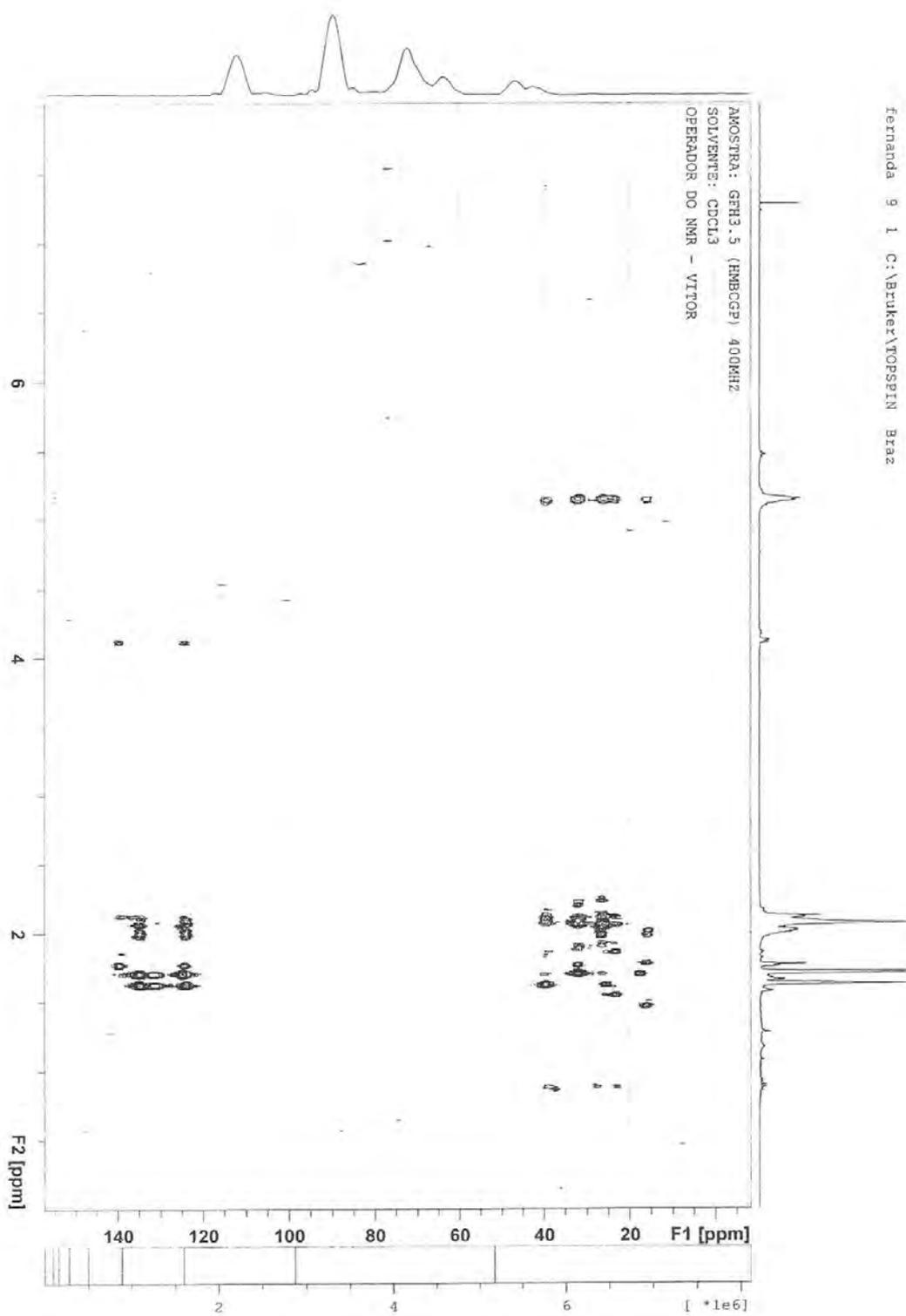
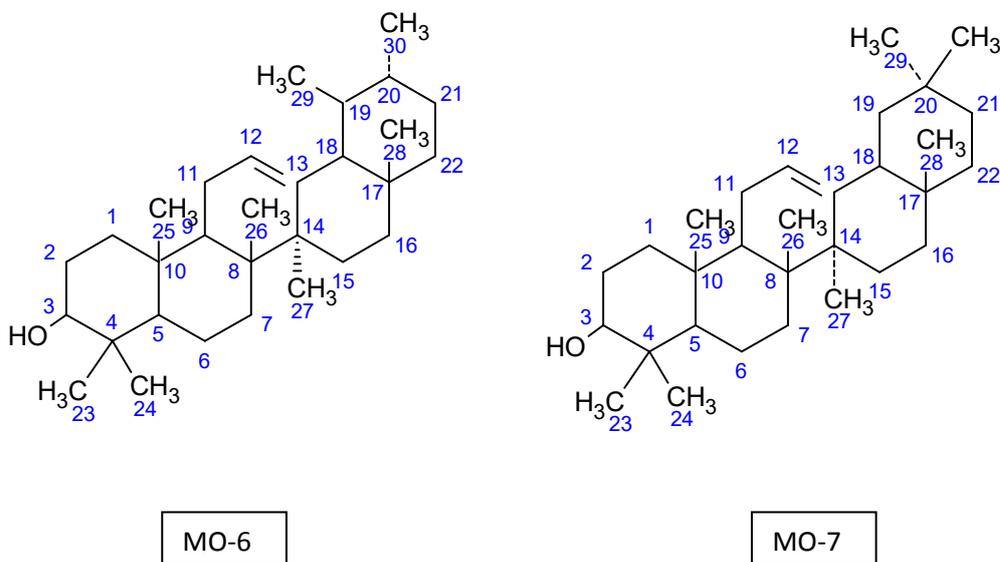


Figura 27: Mapa de correlação do espectro de HMBC (CDCl₃, 400 MHz) de GFH 2.5.

4.1.5 Caracterização da substância GFD 4.1



A amostra GFD 4.1, foi isolada da partição diclorometânica do extrato metanólico de *G. integrifolia*. Após a análise dos dados espectrais de RMN ^1H e RMN ^{13}C do material, permitiu identificá-lo como sendo uma mistura de dois triterpenos pentacíclicos, que são comuns e facilmente encontrados em vegetais. A identificação dos triterpenos foi conseguida, mediante a comparação dos dados obtidos com os descritos na literatura (MAHATO, KUNDU, 1994).

A análise dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C de GFD 4.1 mostrou sinais característicos de triterpenos dos esqueletos do tipo oleano e ursano. Foram observados sinais entre δ_{H} 0,80 e δ_{H} 1,05 correspondentes a hidrogênios metílicos e entre δ_{H} 0,95 e δ_{H} 1,95 referentes aos hidrogênios metilenos. Em δ_{H} 5, 15 aparece uma absorção correspondente ao hidrogênio olefínico em C-12, condizente com a presença da ligação dupla entre os carbonos 12 e 13. A ausência do sinal do próton no espectro em 139.6 e 145.4 ppm confirma a trissubstituição do carbono 13.

O triterpeno α -amirina (esqueleto ursano) apresenta uma metila em C-20 e outra em C-19, com absorção em δ_{C} 39,6 para esses dois carbonos. Já a β -amirina (esqueleto oleanano) apresenta duas metilas em C-20, com absorção em δ_{C} 31,9 (tabela 16, pág. 74).

Portanto, esses dados aliados à comparação com os dados presentes na literatura (MAHATO; KUNDU, 1994) permitem afirmar que a amostra GFD 4.1 é

constituída de mistura binária de triterpenos pentacíclicos portadores de somente uma insaturação: α -amirina (3 β -hidroxi-urs-12-eno) e β -amirina (3 β -hidroxi-olean-12-eno).

Tabela 16: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da lignana **GFD 4.1**, em CDCl_3 , as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC e comparação com valores de referência do modelo **Mo-6 e 7** (MAHATO; KUNDU, 1994).

N° C	α -amirina		MO-6	β -amirina	MO-7
	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)
1	0,95 (7,0 Hz)	38,9	38,7	38,9	38,7
2	1,67 (7,0 Hz)	27,4	27,2	27,3	27,3
3	3,24	78,9	78,3	78,9	79,0
4		38,6	38,7	39,3	38,8
5	0,71	55,1	55,2	55,4	55,3
6	1,60	18,4	18,3	18,2	18,5
7	1,34	32,9	32,9	32,9	32,8
8		39,8	40,0	39,6	38,8
9	1,58	47,7	47,7	47,6	47,7
10		37,7	36,9	37,3	37,6
11	1,95	23,4	23,3	23,7	23,6
12	5,15	124,4	124,3	121,7	121,8
13		139,6	139,3	145,4	145,1
14		41,5	42,0	42,0	41,8
15	1,23 Ha e 1,28 Hb	29,7	28,7	26,1	26,2
16	1,68 Ha e 1,61 Hb	26,6	26,6	26,9	27,0
17		33,7	33,7	32,6	32,5
18	Ha 1,35 e Hb 1,32	59,1	58,9	47,2	47,4
19	1,35	39,6	39,6	46,8	46,9
20	1,32	39,6	39,6	31,9	31,1
21	Ha 1,20 e Hb 1,15	31,3	31,2	34,5	34,8
22	1,28	41,5	41,5	37,2	37,2
23	1,05	28,4	28,1	28,1	28,2
24	0,85	15,7	15,6	15,4	15,5
25	0,80	15,6	15,6	15,5	15,6
26	1,00	16,8	16,8	16,8	16,9
27	0,95	23,3	23,3	26,0	26,0
28	0,82	28,8	28,1	28,4	28,4
29	0,80	17,5	17,4	33,3	33,3
30	0,98	21,4	21,3	23,7	23,7

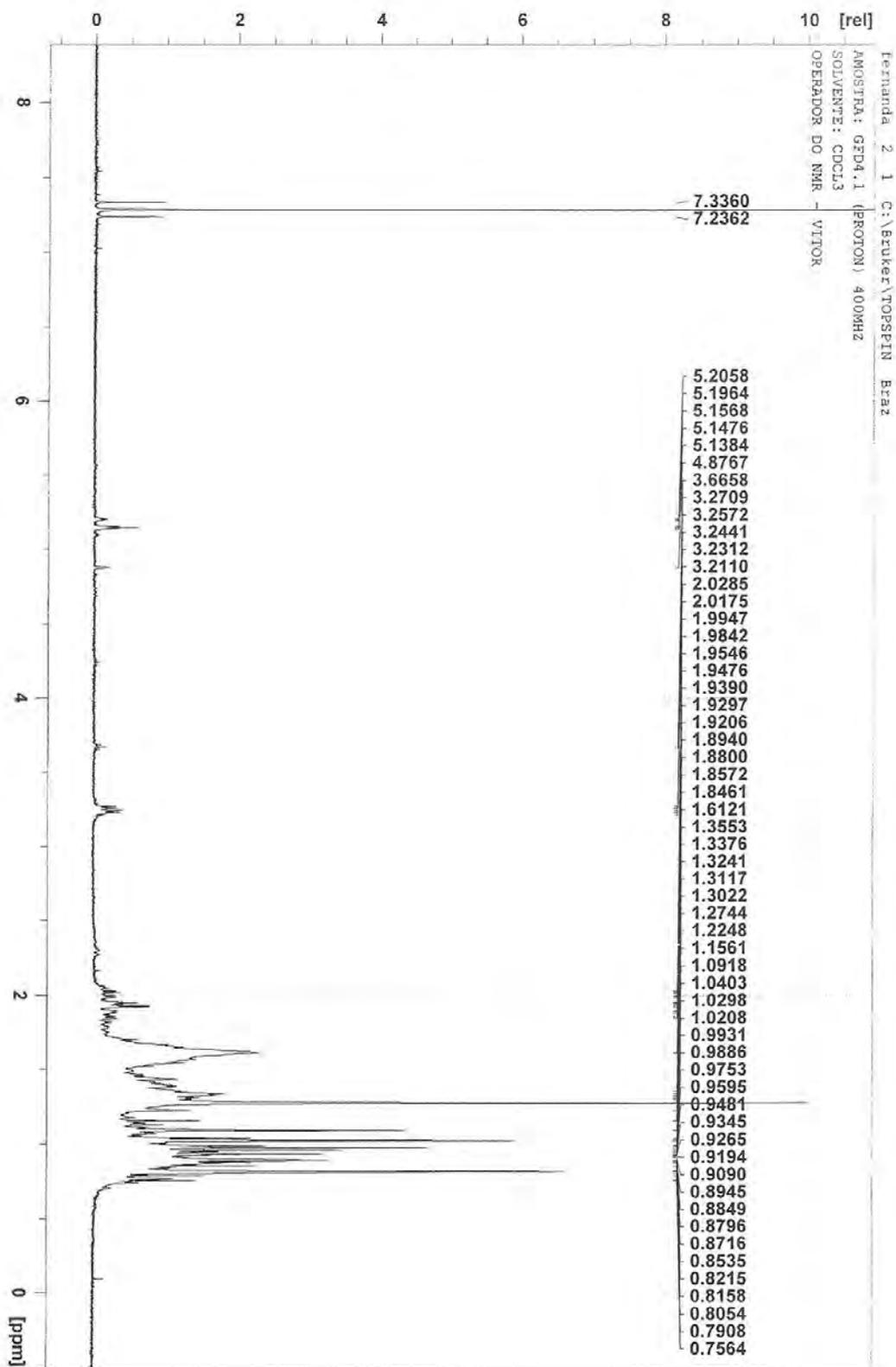


Figura 28: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de GFD 4.1.

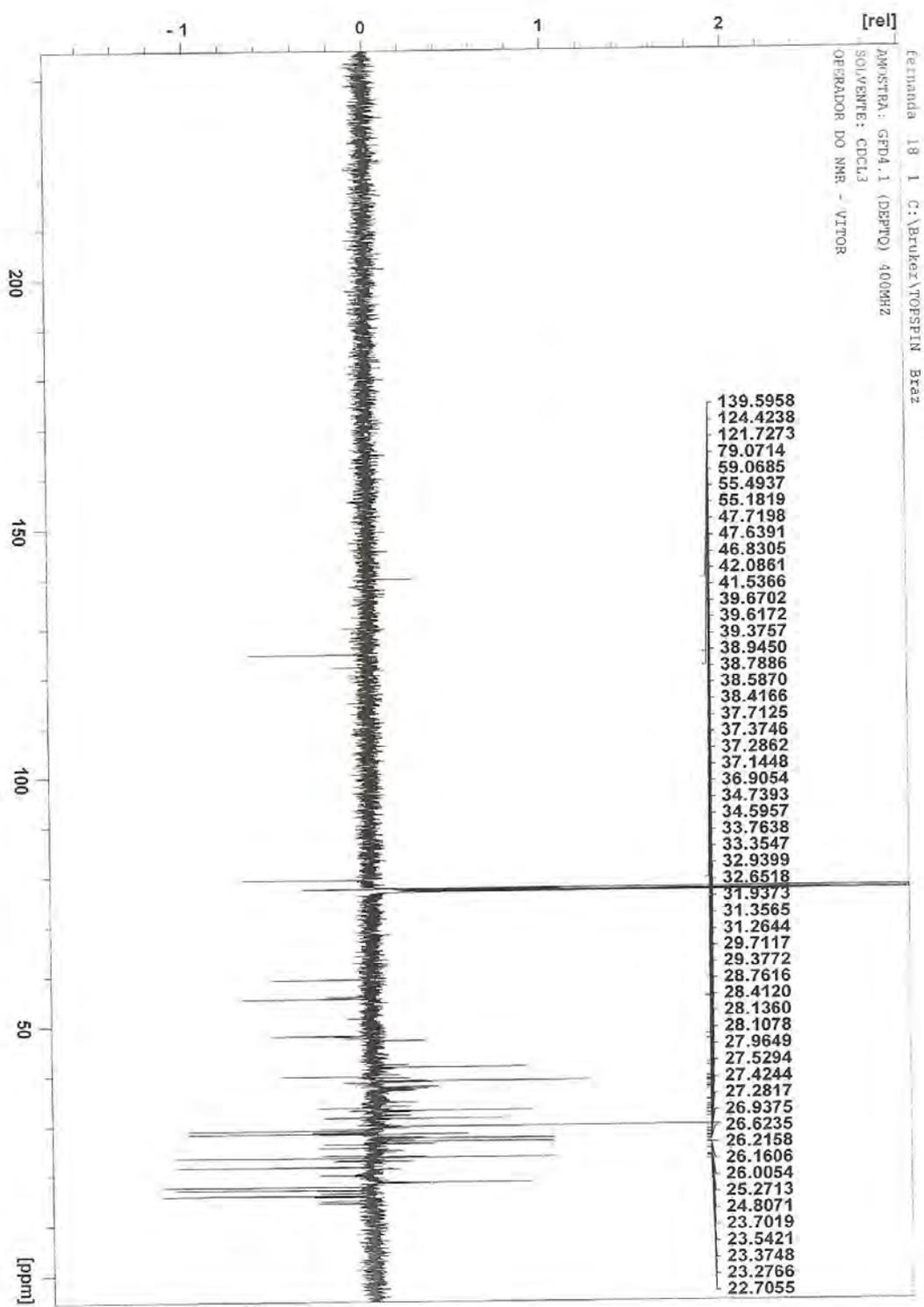


Figura 29: Espectro de RMN ¹³C - DEPT (CDCl₃, 400 MHz) de GFD 4.1.

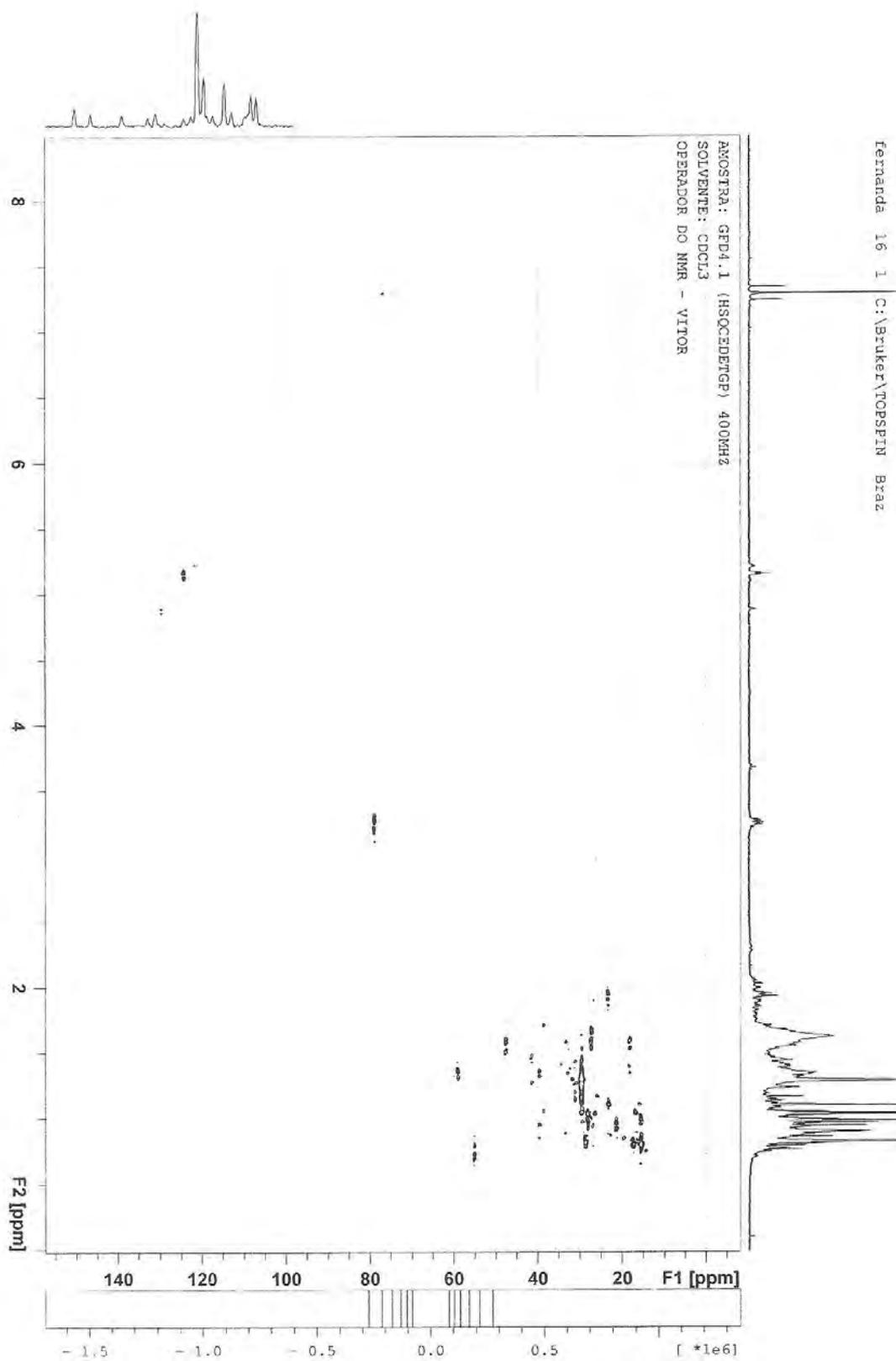


Figura 30: Mapa de correlação do espectro de HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) de GFD 4.1.

4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO E DAS PARTIÇÕES DE *GALLESIA INTEGRIFOLIA*

A atividade antimicrobiana foi testada com o extrato metanólico bruto e para as quatro partições desse extrato, sendo elas hexânica, diclorometânica, acetato de etila e n-butanol, através do método de difusão em Agar e teste em meio líquido.

Espécies da subfamília Rivinoideae (Phytolaccaceae) apresentam diversas atividades biológicas, tais como: anti-inflamatória, moluscida e antifúngica (ESCALANTE, 2002; BENEVIDES *et al.*, 2001). Porém, não existe na literatura, até o presente momento, algum trabalho que correlacione os extratos de *G. integrifolia* e atividade antimicrobiana, sendo estes os primeiros a serem descritos para esta espécie.

4.2.1 Avaliação pelo método Difusão em Agar

4.2.1.1 *Staphylococcus aureus*

No presente estudo, o extrato metanólico bruto e as respectivas partições deste extrato (hexano, acetato de etila, diclorometano e n-butanol), na concentração de 100 mg/poço, assim como o solvente utilizado (DMSO), quando submetidos ao teste microbiológico pelo método de difusão em ágar, não apresentaram halo de inibição para nenhuma das cepas de *S. aureus* testadas, como mostra a tabela 17 (pág. 79). Nesta tabela também estão demonstrados os halos formados pelos controles positivos gentamicina 200 µg/poço e oxacilina 200 µg/poço.

Tabela 17: Média dos halos de inibição (mm de diâmetro) em teste de difusão em Agar a 37°C

Bactéria	Fração	Controles positivos		Fração	Controles positivos		Fração	Controles positivos		Fração	Controles positivos		Extrato bruto	Controles positivos	
		1	GEN		OXA	2		GEN	OXA		3	GEN		OXA	4
<i>S. aureus</i> ATCC	0	25	21	0	25	21	0	25	21	0	25	22	0	22	30
<i>S. aureus</i> Clínica	0	22	28	0	22	28	0	22	28	0	21	29	0	24	29
<i>S. aureus</i> LSA 88	0	12	13	0	12	12	0	12	12	0	11	12	0	11	0
<i>S. aureus</i> COL	0	13	15	0	14	14	0	11	13	0	12	13	0	15	13

hexano (1); diclorometano (2); acetato de etila (3); n-butanol (4); extrato bruto (ET); GEN (gentamicina); OXA (oxacilina)

4.2.1.2 *Candida albicans*

Em nosso estudo, dentre as leveduras testadas em difusão em Agar, a temperatura de 37 °C, *C. tropicalis* foi sensível para as frações hexânica, diclorometânica e n-butanólica na concentração de 100 mg/poço, onde apresentaram zona de inibição acima de 10 mm frente a cepa ATCC 28707 desta levedura. Sendo que a fração diclorometânica apresentou halo de inibição maior do que o antifúngico Itraconazol na concentração de 1mg/poço (tabela 18, pág. 82).

Observou-se ainda, que não houve crescimento fúngico quando foram testados a fração acetato de etila e os antifúngicos na mesma placa frente a *C. tropicalis* ATCC 28707. No entanto, quando essa mesma fração foi testada separadamente dos antifúngicos, não houve efeito inibitório. Ao testar também os controles positivos foi observado que o Itraconazol apresentou um halo relativamente pequeno (10 mm) quando comparado a zona de inibição da Terbinafina, na mesma concentração. Assim, é possível sugerir que foi esse último que influenciou na ação da fração acetato de etila do extrato bruto de *G. integrifolia* (figura 32, pág. 81).

A cepa padrão ATCC 10231 foi sensível somente a fração diclorometânica, enquanto que a cepa clínica de *C. albicans* foi susceptível tanto a fração diclorometânica quanto ao extrato bruto (100 mg/poço) de *G. integrifolia* (tabela 18, pág. 82). Este fato é relevante, uma vez que são essas espécies responsáveis por grande parte das infecções invasivas, conforme dito anteriormente (pág. 25). A Figura 31 (página 81) exemplifica os halos de inibição formados pela fração diclorometânica durante a realização dos testes frente às cepas de *C. albicans*.

Em relação ao extrato bruto, observou-se que este apresentou atividade biológica frente à cepa clínica de *C. albicans* e à cepa padrão de *C. tropicalis* a 37°C, apresentando halo de inibição de 10 mm e 19 mm, respectivamente.

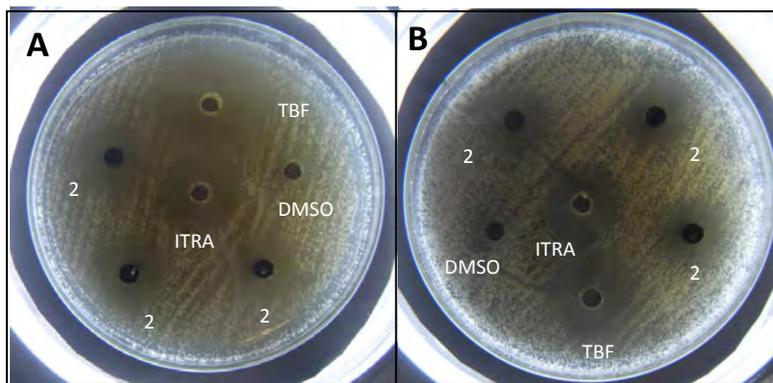


Figura 31: Halos formados pelos poços preenchidos com as frações diclorometânica (2) de *G. integrifolia* frente a cepa clínica (A) e ATCC 10231 (B) de *C. albicans* a 37 °C.

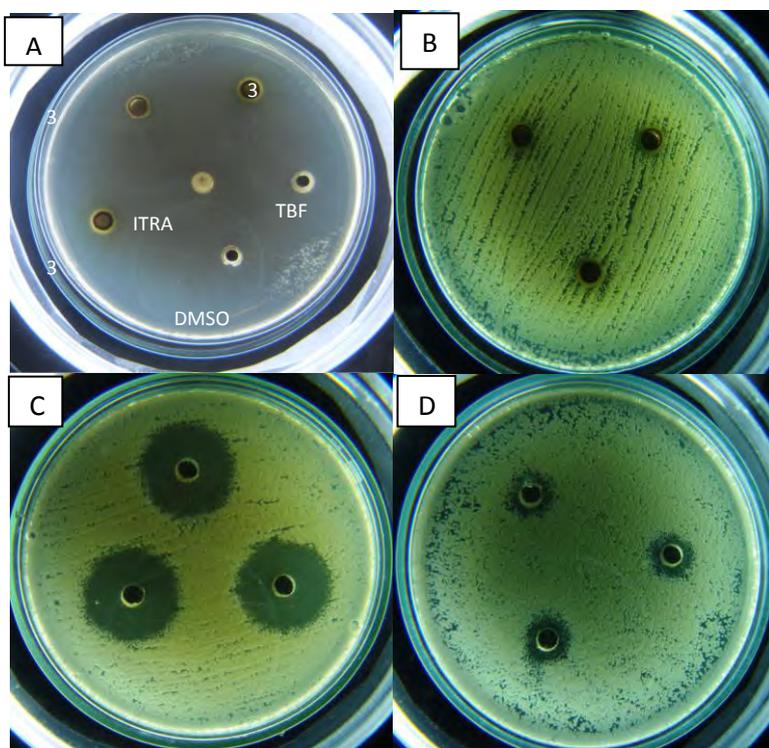


Figura 32: Foto A Sinergismo da fração acetato de etila (3) com os antifúngicos (ITRA e TBF) frente a cepa ATCC 10231 de *C. tropicalis*. Foto B Ausência da inibição do crescimento da levedura quando a fração 3 foi testada separadamente. As fotos C e D mostram o halo de inibição formado pela ação dos antifúngicos controle Terbinafina 1 mg /poço (TBF) e Itraconazol 1 mg/poço (ITRA), respectivamente a 37 °C.

Tabela 18: Média dos halos de inibição (mm de diâmetro) do teste difusão em ágar a 37 °C

Levedura	Fração	Controles positivos		Extrato	Controles positivos										
		ITRA	TBF		ITRA	TBF									
<i>Candida albicans</i> ATCC	0	16*	16	15,3*	16*	18	0	16*	16	0	14	14	0	15	14
<i>Candida albicans</i> Clínica	0	20	17	16,6	20	18	0	20	19	0	20	19	10	32	33
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 28707	15,6	14	30	21,6	13	26	0	10	25	10,6*	10	26	19	18	35

* com crescimento

hexano (1); diclorometano (2); acetato de etila (3); n-butanol; extrato bruto (ET); ITRA (itraconazol); TBF (terbinafina)

Os mesmos testes de difusão em Agar foram realizados na temperatura de 28 °C, pelo fato das espécies de *Candida* apresentarem dimorfismo de acordo com a temperatura (a 28 °C crescimento filamentososo e a 37 °C crescimento leveduriforme). Nesse sentido, foi possível observar que a 28 °C todas as frações apresentaram atividade biológica frente forma filamentososa de *C. albicans* ATCC 10231 com halo variando de 8-22 mm de diâmetro. Outro fato muito importante foi que os antifúngicos itraconazol e terbinafina também apresentaram maior atividade nesta temperatura do que quando o teste foi realizado a temperatura de 37 °C sob a forma leveduriforme dessa levedura. E sabe-se que *C. Albicans* na forma filamentososa é mais invasiva e perigosa do que na sua forma leveduriforme (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Em relação a cepa clínica de *C. albicans* foi observado que as frações diclorometânica e acetato de etila apresentaram halo de inibição de 13 mm de diâmetro e o antifúngico terbinafina também foi mais ativo frente a forma filamentososa (28 °C) do que na forma de levedura (37 °C). Já o itraconazol apresentou o mesmo perfil de inibição para as duas formas desta espécie (tabela 20, pág. 93).

A figura 33 (pág. 83) mostra os halos formados pela fração diclorometânica (2) frente as cepas ATCC 10231 e clínica de *C. albicans* a 28 °C.

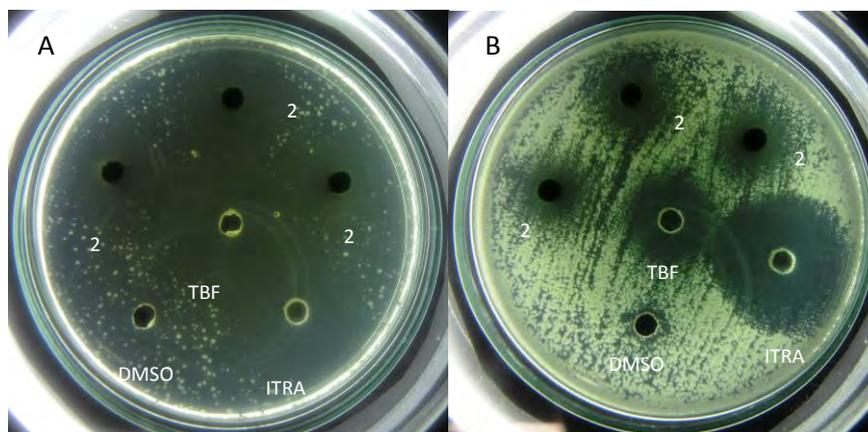


Figura 33: Halos formados pelos poços preenchidos com a fração diclorometânica (2) de *G. integrifolia*, solvente DMSO e os controles positivos (ITRA e TBF) frente a cepa ATCC 10231 (A) e clínica (B) de *C. albicans* a 28 °C.

Frente à cepa *C. tropicalis* a 28 °C foi observado que as frações hexânica, diclorometânica e acetato de etila foram ativas apresentando halo de inibição acima de 12 mm de diâmetro. Enquanto que a fração n-butanólica não apresentou

atividade biológica nesta temperatura, ao contrário do que ocorreu quando a mesma cepa foi testada na temperatura de 37 °C.

Somente a cepa de *C. tropicallis* ATCC 28707, foi sensível ao tratamento com o extrato bruto de *G. integrifolia* tanto a 28 °C quanto a 37 °C, apresentando halo de 20 mm aproximadamente (figura 35, pág. 84) enquanto que as demais leveduras não apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade. Assim, esse resultado demonstra o potencial do extrato bruto da planta sobre a forma filamentosa do fungo.

Em relação aos antifúngicos testados foi observado que ambos apresentaram a mesma média de inibição para as duas temperaturas testada contra *C. tropicallis*.

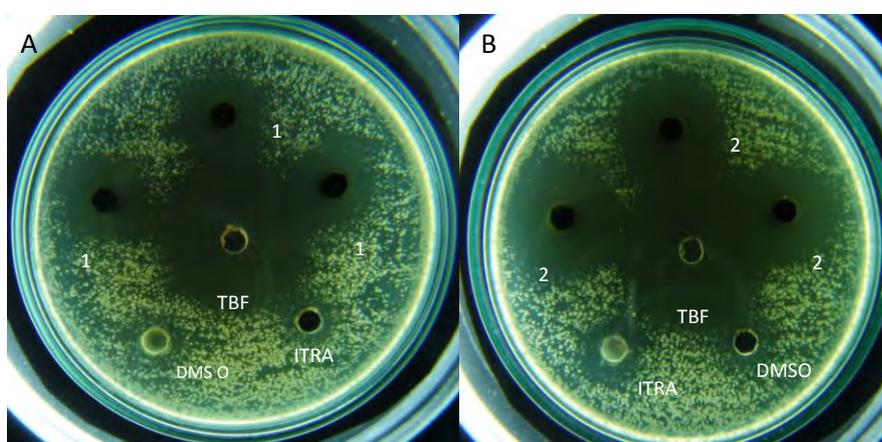


Figura 34: Em A, halos formados pelos poços preenchidos com a fração hexânica (1) e em B os halos formados pela fração diclorometânica (2) frente a cepa ATCC 28707 *C. tropicallis* a 28 °C.

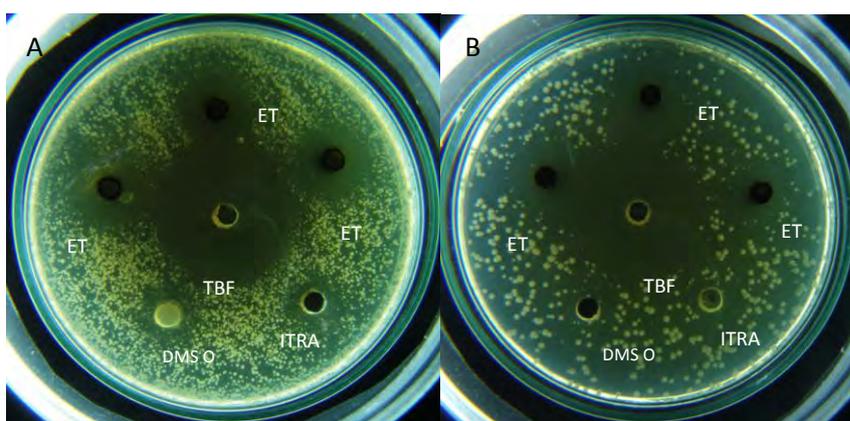


Figura 35: Halos formados pelos poços preenchidos com extrato metanólico bruto de *G. integrifolia*, solvente DMSO e os controles positivos (ITRA e TBF) frente a cepa ATCC 27807 *C. tropicallis* a 28 °C (A) e a 37 °C (B).

A tabela 19 (pág. 86) informa ainda que o extrato bruto não apresenta atividade sobre as linhagens de *C. albicans* , enquanto que as suas partições apresentaram (vide halos), indicando possível antagonismo entre os constituintes químicos da planta. Fato este que não foi observado em *C. tropicallis*, exceto para a fração 4 que não foi ativa contra esta espécie, nem contra *c. Albicans* cepa clínica.

Tabela 19: Média dos halos de inibição (mm de diâmetro) do teste em difusão em Agar a 28 °C

Levedura	Fração	Controles positivos		Extrato ET	Controles positivos										
		ITRA	TBF		ITRA	TBF									
<i>Candida albicans</i> ATCC	11	28	30	18	30	30	20	30	30	8	30	30	0	20	24
<i>Candida albicans</i> Clínica	0	31	22	13	28	18	13	32	18	0	31	18	0	31	18
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 28707	11*	12	28	21	14	28	13	14	32	0	10	28	20	14	28

* com crescimento

hexano (1); diclorometano (2); acetato de etila (3); n-butanol (4); extrato bruto (ET); ITRA (itraconazol); TBF (terbinafina)

4.2.2 Avaliação pelo método em meio líquido

4.2.2.1 *Staphylococcus aureus*

No ensaio em meio líquido frente a quatro cepas de *S. aureus*, foi demonstrado a curva de crescimento destas bactérias na presença das frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e n-butanólica, na concentração de 0,5 mg/ml (gráficos 1-4, pág. 87-88). Foi verificado que a fração hexânica apresentou maior atividade frente as cepas testadas, sendo a cepa padrão ATCC 25923 a mais sensível.

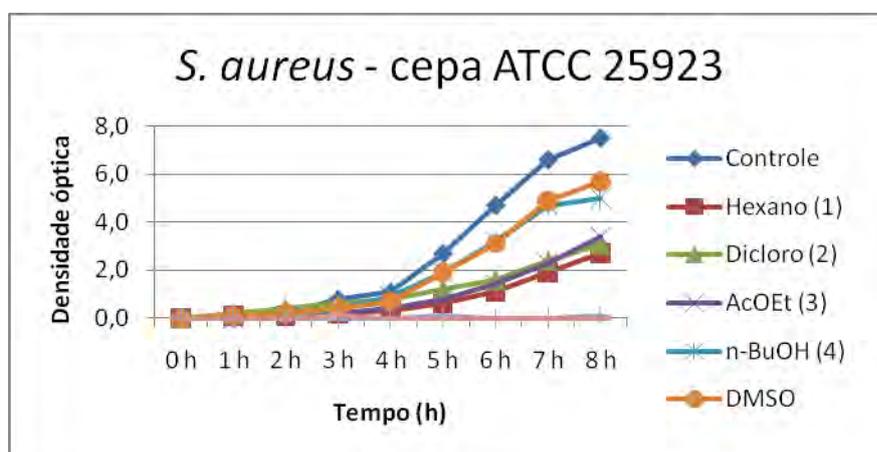


Gráfico 1: Média do crescimento bacteriano das frações de *G. integrifolia* frente *S. aureus* ATCC 25923.

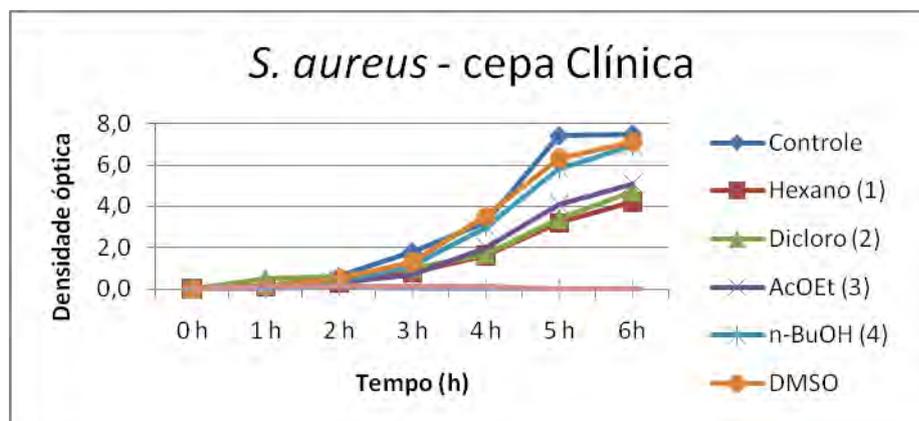


Gráfico 2: Média do crescimento bacteriano das frações de *G. integrifolia* frente a cepa *S. aureus* clínica.

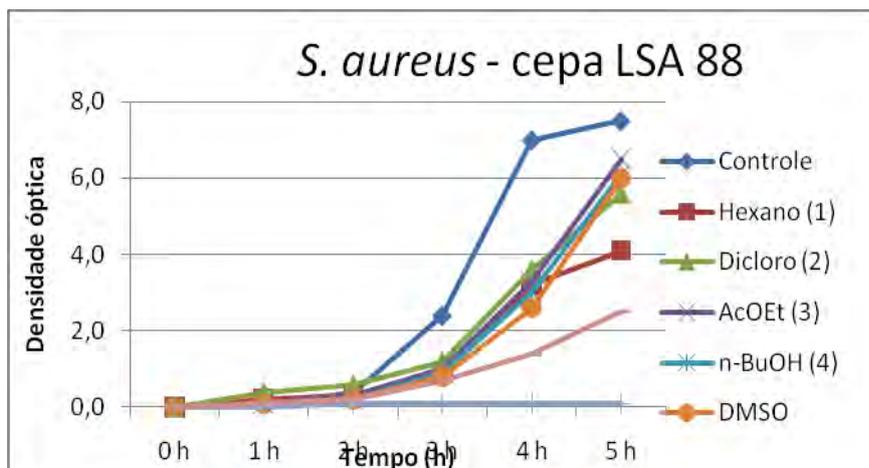


Gráfico 3: Média do crescimento bacteriano das frações de *G. integrifolia* frente a cepa *S. aureus* LSA 88.

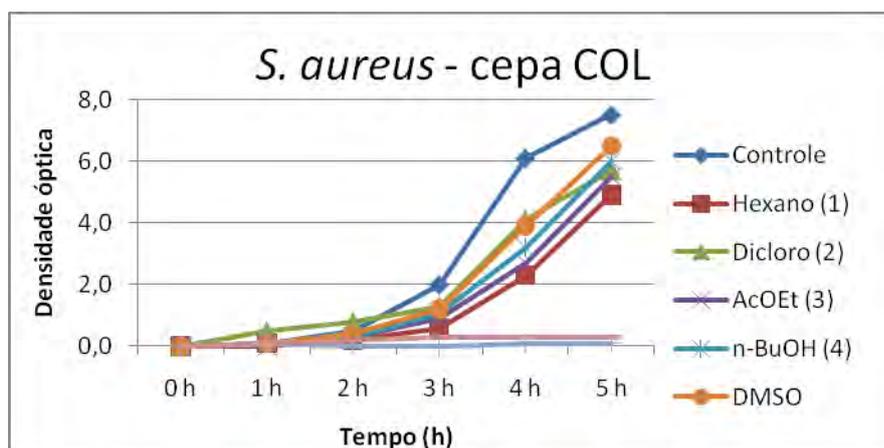


Gráfico 4: Média do crescimento fúngico das frações de *G. integrifolia* frente a cepa *S. aureus* COL.

O gráfico 5 mostra resumidamente o percentual de inibição demonstrados pelas curvas de crescimento acima, em que a cepa padrão ATCC 25923 apresentou maior sensibilidade as frações testadas do que as cepas clínica, LSA 88 (enterotoxigênica) e COL (MRSA). As frações hexânica, diclorometânica e acetato de etila inibiram 64,0%, 58,7% e 54,7%, respectivamente, do crescimento bacteriano desta cepa.

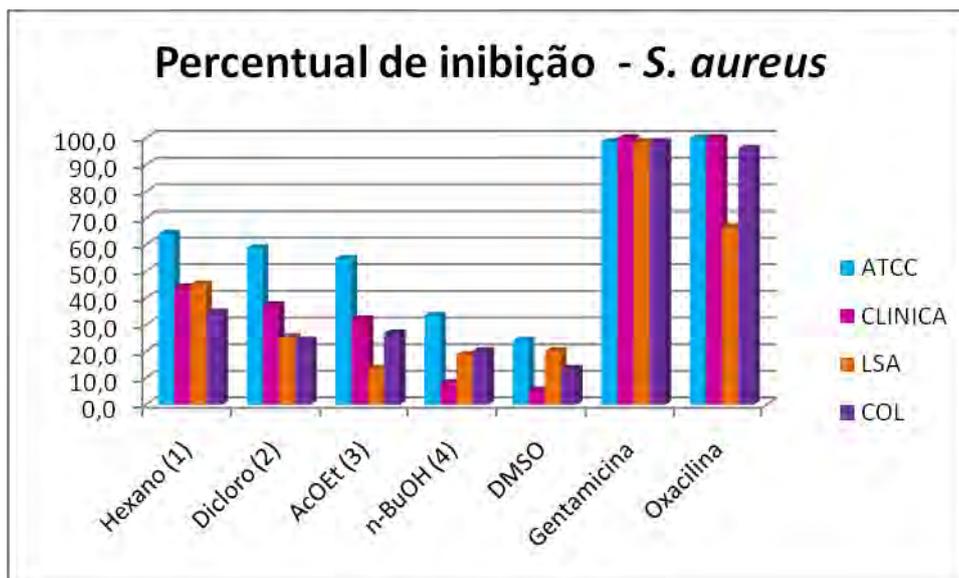


Gráfico 5: Percentual de inibição do crescimento das partições (1, 2, 3 e 4) do extrato metanólico de *G. integrifolia*, dos controles positivos Gentamicina e Oxacilina e do solvente DMSO frente as quatro cepas de *S. aureus*.

4.2.2.2 *Candida albicans* e *C. tropicalis*

No ensaio em meio líquido frente às cepas ATCC 10231 e clínica de *C. albicans*, as frações testadas na concentração de 2,5 mg/ml não apresentaram atividade inibitória relevante a 28 °C. Entretanto, foi observado que o antifúngico utilizado como controle positivo, Itraconazol 0,05 mg/ml, também não apresentou ação fungicida sobre a linhagem ATCC 10231, inibindo apenas 29,3% do crescimento da cepa, juntamente com a fração n-butanólica do extrato bruto de *G. integrifolia*. Já o antifúngico terbinafina apresentou apenas 40 % de inibição frente a cepa clínica de *C. albicans* (gráfico 6 e 7, pág. 90).

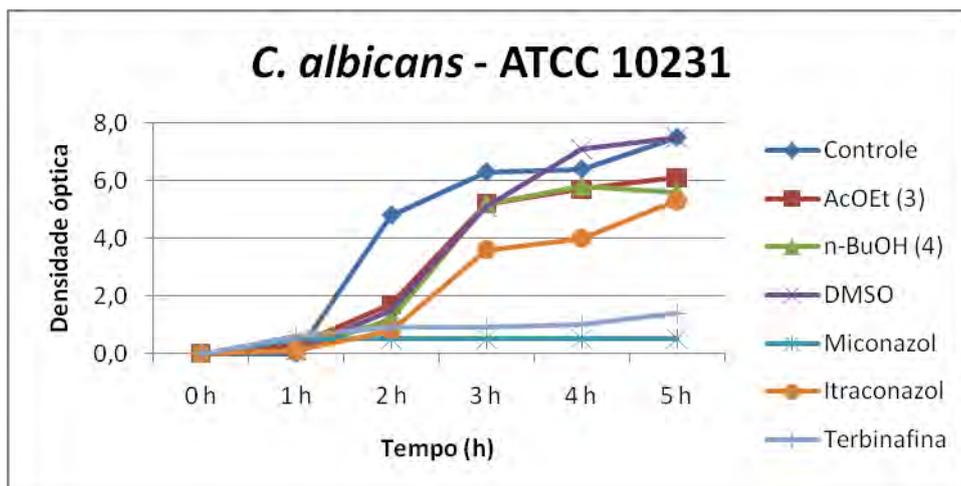


Gráfico 6: Média do crescimento fúngico das frações acetato de etila e n-butanólica de *G. integrifolia* frente a cepa *C. albicans* ATCC 10231.

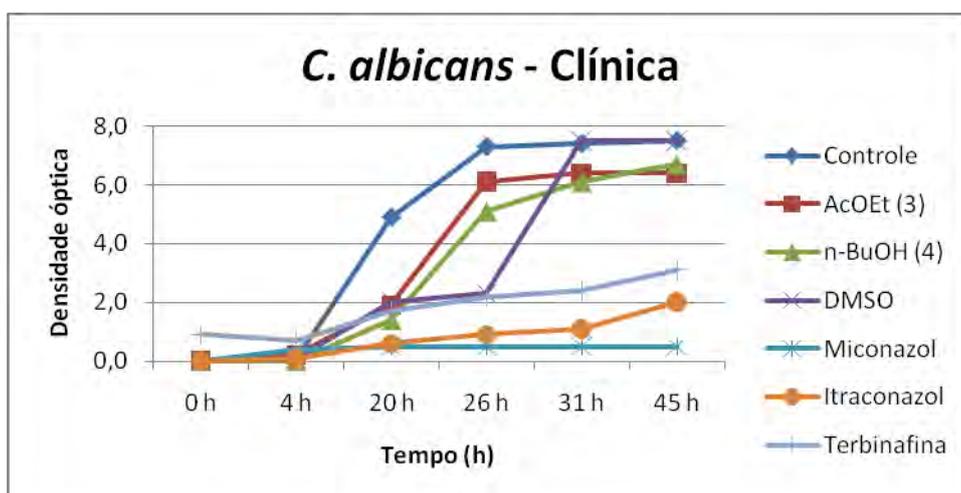


Gráfico 7: Média do crescimento fúngico das frações acetato de etila e n-butanólica de *G. integrifolia* frente a cepa *C. albicans* clínica.

No ensaio com a cepa padrão *C. tropicalis* ATCC 28707, as frações diclorometânica, acetato de etila e n-butanol, na concentração de 2,5 mg/ml, obtiveram um resultado relevante na inibição do crescimento desta cepa, em temperatura ambiente (28°C), inibindo 75 e 58,7 % do crescimento fúngico, respectivamente para as duas últimas frações supracitadas. Pode-se verificar ainda que o percentual de inibição da fração acetato de etila foi equivalente ao do antifúngico Terbinafina. No entanto, o DMSO, também inibiu acima de 35 % do crescimento fúngico (gráfico 8, pág. 91), mostrando que a escolha do solvente pode

influenciar nos testes de sensibilidade antimicrobiana e neste caso o mesmo foi utilizado pelo fato das substâncias extraídas serem mais solúveis em DMSO do que nos demais solventes.

O gráfico 9 mostra a curva de crescimento de *C. tropicalis* ATCC 25923 na presença das frações acetato de etila e n-butanólica. Por causa da turbidez das frações hexânica e diclorometânica quando diluídos em caldo BHI (Broth Heart Infusion, HIMEDIA) não foi possível acompanhar a leitura do crescimento fúngico por espectrofotometria e por isso os mesmos foram plaqueados após o período 7 horas de crescimento, incubados durante 24 h e posteriormente foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs), quando possível. Como pode ser observado na fig. 36 (pág. 92), somente o extrato diclorometânico inibiu o crescimento da levedura na concentração de 2,5 mg/ml, apresentando uma média de 70 UFC/placa.

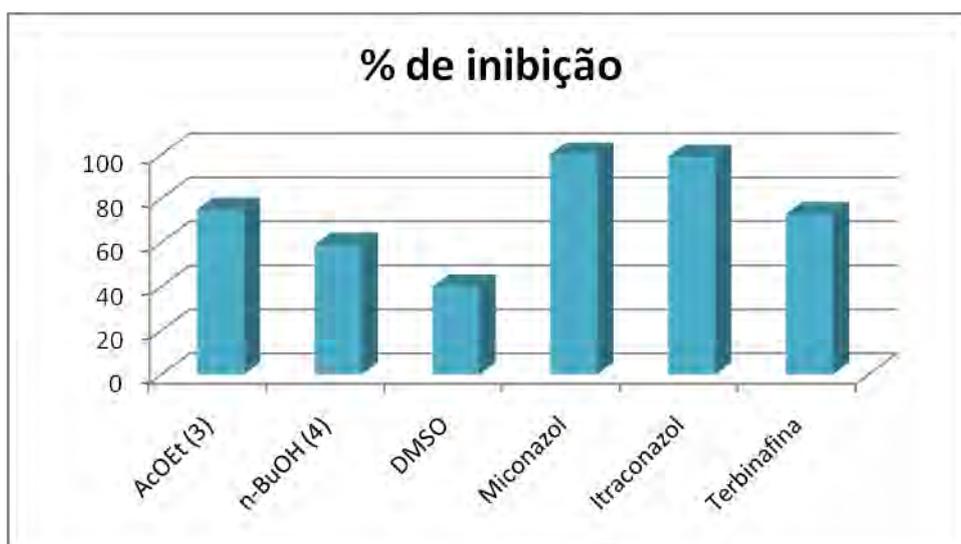


Gráfico 8: Percentual de inibição do crescimento da fração acetato de etila (3) e n-butanol (4), dos controles positivos Miconazol, Itraconazol e Terbinafina e do solvente DMSO frente a *C. tropicalis* ATCC 28707.

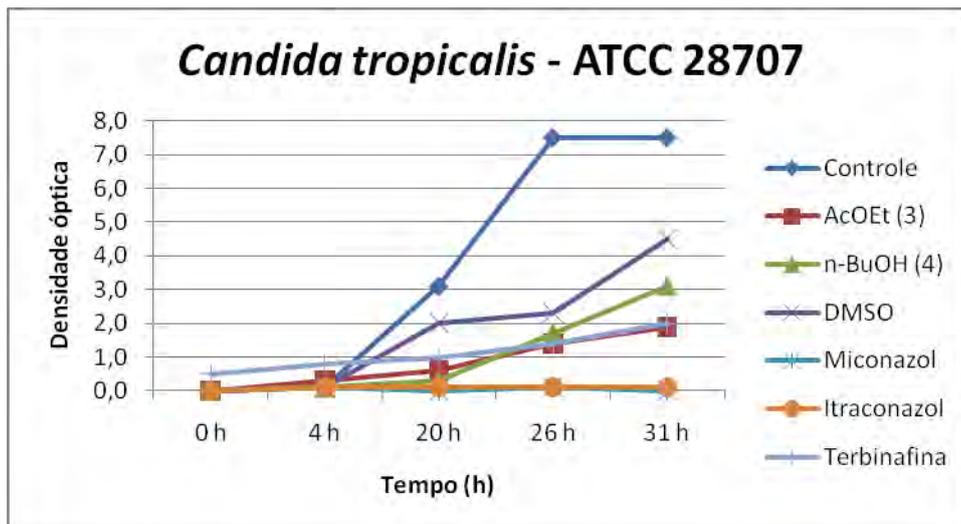


Gráfico 9: Média do crescimento fúngico das frações de *G. integrifolia* frente a linhagem *C. tropicalis* ATCC 28707.

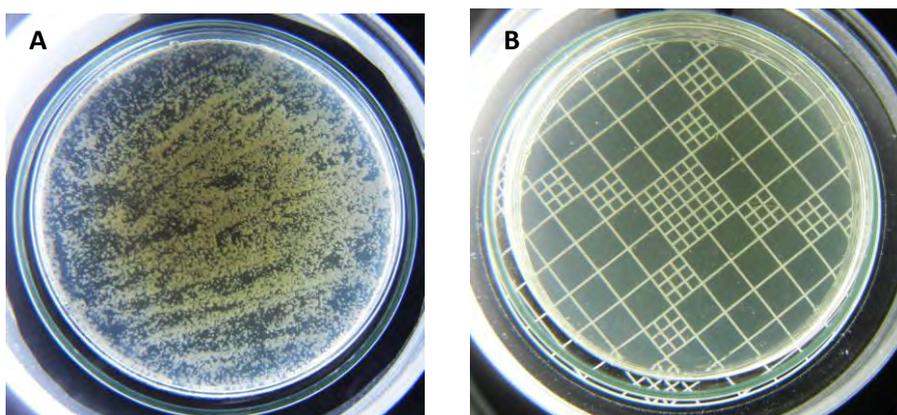


Figura 36: A fração hexânica (50 mg/ml) não inibiu *C. tropicalis* (A) e a fração diclorometânica inibiu o crescimento da levedura (B).

4.2.3 Antibiograma das cepas de *S. aureus* após tratamento com as frações de *G. integrifolia*.

Após a realização do teste em meio líquido com as partições do extrato metanólico de *G. integrifolia*, as soluções contendo o tratamento com as frações e também as soluções contendo aos controles positivos foram submetidas a um antibiograma, com 6 antibióticos utilizados na clínica e verificado se após o

tratamentos as bactérias tornaram-se mais sensíveis ou menos sensíveis aos antibióticos.

Os resultados dos testes de resistência e sensibilidade das cepas de *S. aureus* após o tratamento com as frações hexano, acetato de etila, diclorometano e n-butanol podem ser verificados nas Tabelas 20 a 23 (pág. 93 a 94).

Tabela 20: Antibiograma (medido em milímetros) de cepas de *S. aureus* tratadas com extratos e submetidos a 6 antibióticos pelo método de difusão em ágar.

<i>S. aureus</i> COL (MRSA)							
Antibiótico [] padrão	Média dos halos de inibição (mm de diâmetro)						
	Partição	Partição	Partição	Partição	Controles positivos		CONTROLE
	1	2	3	4	GEN	OXA	
Clindamicina 2 µg	0	0	0	0	Bactericida, só cresceram 4 colônias	10	0
Oxacilina 1 µg	0	0	15 ↑	0		0	8
Vancomicina 30 µg	15 ↓	14 ↓	13 ↓	16 ↓		23	17
Cefalexina 30 µg	15 ↑	9 ↓	10	9 ↓		0	11
Sulfametoxazol + trimetropina 25 µg	22 ↑	26 ↑	25 ↑	25 ↑		30	20
Gentamicina 10 µg	9 ↑	10 ↑	9 ↑	10 ↑		16	8

hexano (1); diclorometano (2); acetato de etila (3); n-butanol (4); GEN (Gentamicina); OXA (Oxacilina);
 ↑: mais sensível; ↓: menos sensível

Tabela 21: Antibiograma (medido em milímetros) de cepas de *S. aureus* tratadas com extratos e submetidos a 6 antibióticos pelo método de difusão em ágar.

Cepa <i>S. aureus</i> CLINICA							
Antibiótico [] padrão	Média dos halos de inibição (mm de diâmetro)						
	Partição	Partição	Partição	Partição	Controles positivos		CONTROLE
	1	2	3	4	GEN	OXA	
Clindamicina 2 µg	20	20	19	21 ↑	32	32	19
Oxacilina 1 µg	18 ↑	20 ↑	11 ↓	15	25	26	15
Vancomicina 30 µg	13 ↑	14 ↑	10	12 ↑	18	22	10
Cefalexina 30 µg	21 ↑	21 ↑	20	18	30	29	19
Sulfametoxazol + trimetropina 25 µg	24 ↑	25 ↑	21	20	30	30	21
Gentamicina 10 µg	15 ↑	15 ↑	14 ↑	12	26	25	12

hexano (1); diclorometano (2); acetato de etila (3); n-butanol (4); GEN (Gentamicina); OXA (Oxacilina)
 ↑: mais sensível; ↓: menos sensível

Tabela 22: Antibiograma (medido em milímetros) de cepas de *S. aureus* tratadas com extratos e submetidos a 6 antibióticos pelo método de difusão em ágar.

Cepa <i>S. aureus</i> LSA 88							
Antibiótico [] padrão	Média dos halos de inibição (mm de diâmetro)						
	Partição	Partição	Partição	Partição	Controles positivos		CONTROLE
	1	2	3	4	GEN	OXA	
Clindamicina 2 µg	19	20	19	21 ↑	Bactericida, só cresceram 3 colônias	30	19
Oxacilina 1 µg	0	0	0	0		9	0
Vancomicina 30 µg	20	20	19	19		21	20
Cefalexina 30 µg	11	11	12	11		11	11
Sulfametoxazol + trimetropina 25 µg	20 ↓	20 ↓	19 ↓	20 ↓		29	22
Gentamicina 10 µg	10 ↓	12	11	12		17	12
hexano (1); diclorometano (2); acetato de etila (3); n-butanol (4); GEN (Gentamicina); OXA (Oxacilina) ↑: mais sensível; ↓: menos sensível							

Tabela 23: Antibiograma (medido em milímetros) de cepas de *S. aureus* tratadas com extratos e submetidos a 6 antibióticos pelo método de difusão em ágar.

Cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923							
Antibiótico [] padrão	Média dos halos de inibição (mm de diâmetro)						
	Partição	Partição	Partição	Partição	Controles positivos		CONTROLE
	1	2	3	4	GEN	OXA	
Clindamicina 2 µg	26	25	26	28 ↑	20	0	25
Oxacilina 1 µg	26	25	25	26	31	0	26
Vancomicina 30 µg	18	17	17	18	25	0	17
Cefalexina 30 µg	27	27	26	26	40	0	26
Sulfametoxazol + trimetropina 25 µg	25	25	25	25	35	0	25
Gentamicina 10 µg	21	21	21	21	26	0	21
hexano (1); diclorometano (2); acetato de etila (3); n-butanol (4); GEN (Gentamicina); OXA (Oxacilina) ↑: mais sensível; ↓: menos sensível							

Considerando a comparação dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano nos ensaios com os antibióticos na solução controle e após o tratamento com as partições, pode-se observar, em algumas interações, a ocorrência de interferência do extrato vegetal de *G. integrifolia* sobre o poder antibacteriano dos antibióticos. Esta interferência ocorreu, principalmente, nas interações com a cepa Clínica de *S. aureus*, onde as frações apresentaram variados graus de susceptibilidade. Entretanto, para a cepa enterotoxigênica LSA 88 do mesmo patógeno, as frações não influenciaram significativamente a ação dos

antibióticos e quando influenciou, não houve interferência positiva das associações testadas, ao contrário todas as frações apresentaram efeito antagônico ao antibiótico sulfametoxazol + trimetropina. Quanto à cepa ATCC 25923, esta foi a que menos sofreu interferência das frações sobre os antibióticos testados.

O antibiótico clindamicina foi o que menos teve interferência das frações do extrato metanólico bruto de *G. integrifolia*. Já sulfametoxazol + trimetropina e gentamicina foram os antibióticos que tiveram maior interferência das frações, sendo observada, na maioria das interações, uma maior sensibilidade, principalmente para gentamicina.

Concernente ao extrato vegetal verificado neste estudo verificou-se que todas as frações do extrato vegetal interferiram de algum modo na sensibilidade dos antibióticos e pode-se dizer que na maioria das interações, esta interferência apresentou-se como uma maior sensibilidade à atividade dos antibióticos. As frações hexânica (menos polar) e diclorometânica (polaridade intermediária) apresentaram maior interferência no perfil de sensibilidade dos antibióticos testados, apresentando efeito positivo na maioria destas interações. Esse fato pode indicar que as substâncias mais apolares das frações obtidas após partição do extrato bruto de *G. integrifolia* poderiam ser os agentes responsáveis pela atividade antimicrobiana da espécie em estudo e até mesmo, poderiam ainda ser promissores contra cepas fúngicas de *Candida sp* desta estirpe fúngica. Destas frações, realizamos o isolamento de metabólitos especiais oriundos da rota biossintética do mevalonato, tais como terpenos e porfirinas.

De maneira geral, a característica da interferência exercida pelas frações de *G. integrifolia* variou de acordo com o tipo do antibiótico, polaridade das frações testadas em associação e o tipo da cepa bacteriana ensaiada. Da mesma forma, as plantas medicinais e/ou seus subprodutos podem atuar inibindo ou intensificando o efeito terapêutico dos medicamentos convencionais, bem como não interferir na resposta esperada (Nascimento *et al.*, 2000). Por esse motivo, este estudo se faz importante, uma vez que foi verificado que a infusão das folhas de *G. integrifolia* tem sido utilizada pela população (mostrado também nesse estudo), como antimicrobiano para o tratamento de bronquites e micoses (tabela 12, pág. 41) e

pode vir também a interferir no tratamento terapêutico de doenças de etiologia bacteriana e fúngica.

4.2.4 Método da diluição seriada em meio de cultura líquida para *S. aureus*

A atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto de *G. integrifolia* foi avaliada pelo método da diluição em série frente às cepas ATCC 25923, clínica, COL e LSA 88 de *S. aureus*.

O extrato bruto teve efeito bactericida quando as cepas foram cultivadas em meio líquido contendo 33 mg/ml do extrato bruto. Concentrações iguais ou superiores a 11 mg/ml não promoveram inibição, sendo similares ao controle. A figura 37 mostra a atividade antimicrobiana do extrato bruto frente à cepa COL resistente à meticilina (MRSA).

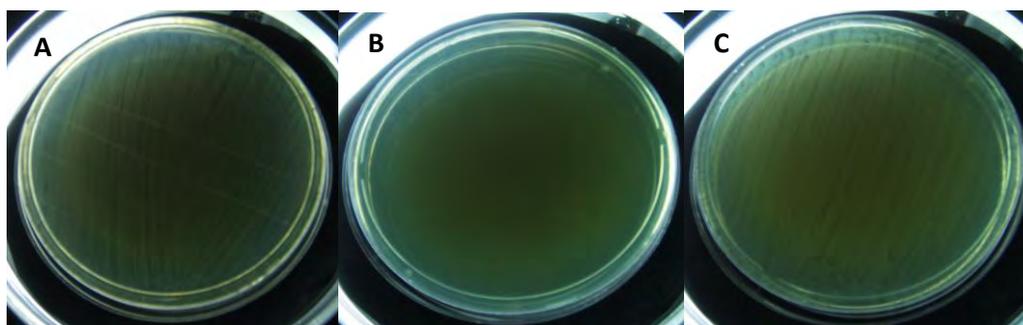


Figura 37: Atividade antimicrobiana do extrato bruto de *G. integrifolia* frente à cepa COL: Controle (A); efeito bactericida na concentração 33 mg/ml (B) e crescimento bacteriano confluyente similar ao controle na concentração de 11mg/ml a 37 °C.

4.2.5 Método da diluição seriada em meio líquido para *C. albicans* e *C. tropicalis*

Foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto de *G. integrifolia* pelo método da diluição em série frente às cepas padrão ATCC 10231 e clínica de *C. albicans* e a cepa padrão ATCC 28707 de *C. tropicalis* em duas temperaturas diferentes, a 28 °C e 37 °C.

Na temperatura de 28 °C, o extrato bruto de *G. integrifolia* apresentou efeito fungicida contra a cepa padrão de *C. tropicalis* quando estas foram cultivadas na

presença de 33 mg/ml deste extrato, enquanto que na concentração de 11 mg/ml sua atividade tornou-se fungistática devido ao crescimento de unidades formadoras de colônias (170 UFC) quando comparado ao controle. Em concentrações iguais ou inferiores a 3,7 mg/ml não houve efeito inibitório havendo, portanto, crescimento em confluência (figura 38, pág. 97).

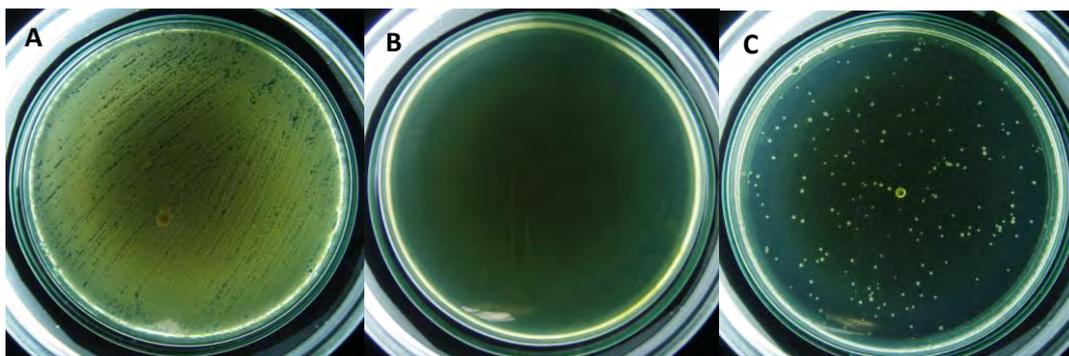


Figura 38: Atividade antifúngica do extrato bruto de *G. integrifolia* frente à cepa padrão *C. tropicalis* ATCC 28707 : Controle (A); efeito fungicida na concentração 33 mg/ml (B) e efeito fungistático na concentração de 11 mg/ml a 28 C.

O extrato metanólico bruto de *G. integrifolia* não foi considerado fungicida quando foram testados frente a cepa padrão de *C. albicans*, mas promoveram diminuição expressiva do número de unidades formadoras de colônia – UFC – (presença de inibição) quando comparado ao controle na concentração de 33 mg/ml. Em relação à cepa clínica desta levedura houve um efeito inibitório significativo na concentração de 33 mg/ml, no entanto em concentrações inferiores houve crescimento em confluência das colônias (>300 UFC) a 28°C, como mostra a figura 39, pág. 97.

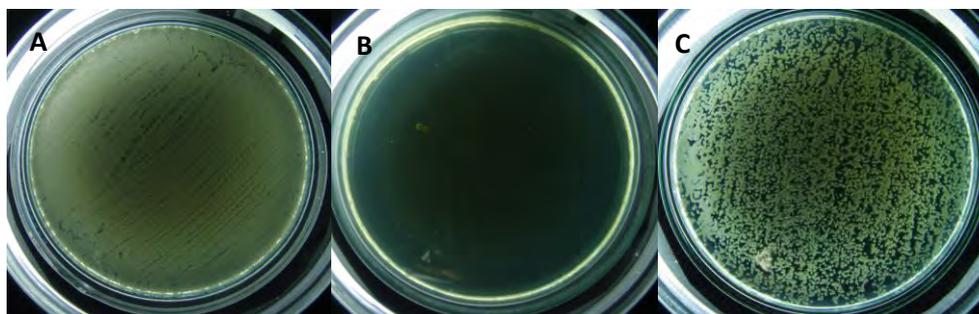


Figura 39: Atividade antifúngica do extrato bruto de *G. integrifolia* frente à cepa clínica de *C. albicans*: Controle (A); efeito fungistático na concentração 33 mg/ml (B) e confluência de colônias na concentração de 11 mg/ml a 28 °C.

Em relação aos testes realizados com as candidas em temperatura de 37 °C, o extrato bruto mostrou-se mais eficaz frente à cepa padrão de *C. tropicalis*, apresentando atividade fungicida nas concentrações de 33 mg/ml e 11 mg/ml, além de apresentar uma diminuição significativa no número de UFCs, na concentração de 3,7 mg/ml (figura 40, pág. 98) em relação ao controle. A cepa clínica de *C. albicans* foi inibida somente na concentração de 33 mg/ml e a cepa padrão *C. albicans* ATCC 10231 apresentou crescimento confluyente em todas as concentrações.

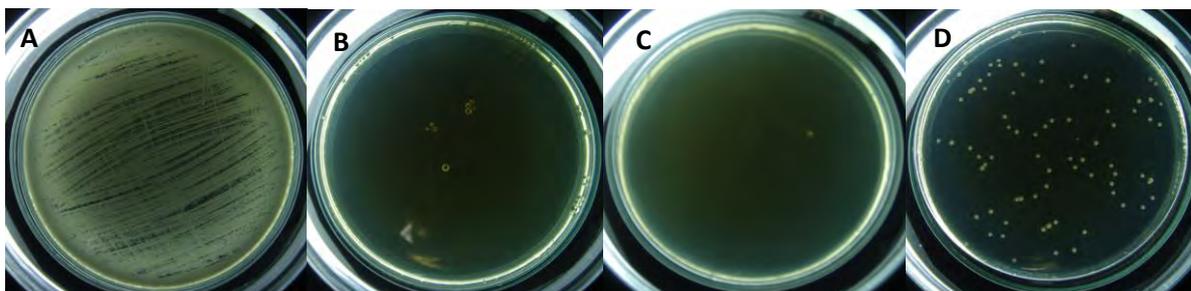


Figura 40: Atividade antifúngica do extrato bruto de *G. integrifolia* frente à cepa padrão de *C. tropicalis*: Controle (A); efeito fungicida na concentração 33 mg/ml (B) e na concentração de 11 mg/ml (C) e efeito fungistático na concentração de 3,7 mg/ml (D) a 37 °C.

5. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico de *Gallesia integrifolia* atingiu seu objetivo nesta etapa, ao contribuir para o conhecimento da quimiotaxonomia da família Phytolaccaceae.

Através de métodos cromatográficos e técnicas espectroscópicas de RMN ¹H e ¹³C uni e bidimensionais e comparações com os dados da literatura foi possível isolar e identificar seis constituintes químicos de *Gallesia integrifolia* inéditos no gênero, sendo definidas as estruturas químicas como duas porfirinas: 7c-metoxifeoforbídeo a (GFDCC-15) e 7c-metoxi-10-hidroxifeoforbídeo a (GFH12.6), três triterpenos, sendo uma mistura binária α -amirina e β -amirina (GFD 4.1) e o Hexaprenol (GFH 2.5), além de um diterpeno inédito na literatura, o 15-hidroxi-13-clerodeno (GFH 3.9). Portanto, a espécie em estudo é rica em metabólitos especiais oriundos da rota biossintética do mevalonato, tais como terpenos e porfirinas.

As partições do extrato metanólico se mostraram promissoras no que diz respeito a atividade antimicrobiana frente a *C. tropicalis* e *albicans* e ainda sobre

uma cepa de *S. aureus*. Portanto, deve-se ressaltar a importância da continuação dos testes biológicos, testando também as substâncias isoladas na busca de novos antimicrobianos que possam ser úteis na terapêutica.

REFERENCIAS

AKISUE, M. K.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F. Caracterização farmacognóstica de pau d'álho: *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.1, n. 2, p. 166 – 182,1986.

ALBUQUERQUE, U. P. A Etnobotânica no Nordeste Brasileiro. In: CAVALCANTI, T. B., (Org.). **Tópicos atuais em botânica**: Palestras convidadas do 51º Congresso Nacional de Botânica. Brasília: Embrapa, 2000, p.241-249.

ALBUQUERQUE, U. P., HANAZAKI N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 678-689, 2006.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.141, p. 399-436, 2003.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.161, p. 105-121, 2009.

ANWAR, A. *et al.* Naturally occurring reactive sulfur species, their activity against Caco-2 cells, and possible modes of biochemical action. *Journal of Sulfur Chemistry*, v. 29, p. 251-268, 2008.

APPEL *et al.* Phytolaccagenic acid and phytolaccagenin from *Anisomeria coriacea*. *Planta Medica*, v. 53, p. 115, 1987.

APPEL, H. H. CHAMY, M. C. Nota sobre la presencia de trifenilmetano y difenilmetano em la *Anisomeria chilensis* (Miers) Walt 1 c. *Scientia*, v. 44, n. 152, 1979.

APPEL, H. H.; HORRA, M. Chemical composition of *Anisomeria coriacea*. *Scientia*, v. 31, n. 125, p. 34-36, 1964.

BARBOSA, L. C. A. *et al.* Chemical constituents of the bark of *Gallesia gorazema*. *Fitoterapia*, v. 70, p. 152-156, 1999.

BARBOSA, L. C. A. *et al.* Vitamin E and other chemical constituents of the leaves of *Gallesia gorazema*. *Fitoterapia*, v. 68, n. 6, p. 515-519, 1997.

BARROS, U. S. S; SILVA, A.; AGUIAR, B. I. Germinação de sementes de *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms (pau-d'álho) sob diferentes condições de temperatura, luz e umidade do substrato. *Revista Brasil Botânica*, v. 28, n.4, p.727-733, 2005.

BARROSO *et al.* Sistemática de Angiospermas do Brasil. Viçosa: UFV, 2.ed., 309 p., 2002.

BAUER *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, p. 493-496. 1966.

BENDEL, C. M.; HOSTETTER, M. K. Distinct Mechanisms of Epithelial Adhesion for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Identification of the Participating Ligands and Development of Inhibitory Peptides. *The American Society for Clinical Investigation*, v. 92, p.1840-1849, 1993.

BERTHOD, A.; CARDA-BROCH, S. Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods. *Journal of Chromatography A*, v. 1037, p. 3-14, 2004.

BENEVIDES *et al.* Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L. *Phytochemistry*, v. 57, p. 743-747, 2001.

BLAINSKI *et al.* Dual effects of crude extracts obtained from *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae) on experimental anxiety in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v.128, p. 541–544, 2010.

BORBA, A. M.; MACEDO, M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. *Acta Botânica Brasílica*, v. 20, n. 4, p. 771-782, 2006.

BRASIL. Medida provisória nº 2.186-16, DE 23 DE AGOSTO DE 2001. Regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição, os arts. 1º, 8º, alínea "j", 10, alínea "c", 15 e 16, alíneas 3 e 4 da Convenção sobre Diversidade Biológica, dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências. Disponível em <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/mpv/2186-16.htm>. Acesso: em 23 novembro 2011.

BRASIL. Decreto nº 2.519, de 16 de março de 1998. Promulga a Convenção sobre Diversidade Biológica, assinada no Rio de Janeiro, em 05 de junho de 1992. **Presidência da República Federativa do Brasil.** Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1998/anexos/and2519-98.pdf>. Acesso: em 23 novembro 2011.

BRAZ-FILHO. Contribuição das substâncias fito-orgânicas como agentes medicinais. *Revista de Medicina da UFC*, v. 34, 1994.

BUFFON, D. E. **Isolamento e identificação de princípios ativos de *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae).** 2005. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

BUSSMANN, R. W.; GLENN, A. Medicinal plants used in Peru for the treatment of respiratory disorders. *Revista Peruana de Biología*, v. 17, n.2, p. 331 – 346, 2010.

CARLOS *et al.* *Rauvolfia grandiflora* (Apocynaceae) extract interferes with staphylococcal density, Enterotoxin production and antimicrobial activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 612-620, 2010.

CARNEIRO, M. R. B. **A flora medicinal no Centro Oeste do Brasil: um estudo de caso com abordagem Etnobotânica em Campo Limpo de Goiás.** 2009. 240 f. Dissertação (Mestrado em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente) - Centro Universitário de Anápolis – UniEVANGÉLICA, Anápolis, 2009.

CEVALLOS-FERRIZ *et al.* Phytolaccaceae infructescence from Cerro del Pueblo formation, upper cretaceous (late campanian), Coahuila, Mexico. *American Journal of Botany*, V. 95, p. 77–83, 2008.

CHEE *et al.* Photocytotoxic Pheophorbide- Related Compounds from *Aglaonema simplex*. *Chemistry & Biodiversity*, v. 2, n. 12, p. 1648-1655, 2005.

COSTA, M.; FUJIWARA, F. Y.; IMAMURA, P. M. Assignment of ¹³C NMR data of methyl (+)-hardwickiate and its derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 36, p. 542-544, 1998.

CUENOUD *et al.* Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid rbcL, atp B and matK DNA sequences. *American Journal of Botany*, v. 89, p. 132-144, 2002.

DANTAS *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. *RBAC*, v. 42, p.33-37, 2010.

DELLE MONACHE; Suarez. 6-C-Formyl and 6-C-hydroxymethyl flavanones from *Petiveria alliacea* [leaves] *Phytochemistry*, v. 31, n. 7, p. 2481-2482, 1992.

DIEGUES, A.C.; ARRUDA, R.S.V. **Saberes tradicionais e biodiversidade no Brasil.**(Biodiversidade 4). Brasília: Ministério do Meio Ambiente; São Paulo: USP. 176p. 2001. Disponível em < <http://www.usp.br/nupaub/saberes/saberes.htm>>. Acesso: em 23 novembro 2011.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. *Ciência e Cultura*, v. 55, n. 3, p. 35-36, 2003.
ESCALANTE *et al.* Isolation of antifungal saponins from *Phytolacca tetramera*, an Argentinean species in critic risk. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 82, p. 29-34, 2002.

FEIJO, N. S. A. **Crescimento e comportamento fotossintético de *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms e *Schinus terebinthifolius* Raddi sob condições de sombra densa.** 2008. 46 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia, 2008.

FEITOSA, C. M.; Bezerra, M. Z. B. Constituintes químicos de *Philodendron imbe* Schott. *Quim. Nova*, V. 30, p. 41-44, 2007.

FORZZA *et al.* Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Rio de Janeiro : Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 2, 2010.

FREITAS *et al.* Variação genética para caracteres quantitativos em população de *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms. *Revista do Instituto Florestal*, v. 20, n. 2, p. 165-173, 2008.

GELINSKI *et al.* Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) e de seu composto ativo nerolidol em combinação ao EDTA ou lisozima. *Evidência*, v. 7, n. 2, p. 131-144, 2007.

GODOFREDO, V. R. **Ontogênese, função e evolução das traqueídes vasculares em Cactaceae, tendo como modelo o cacto colunar *Pilosocereus aurisetus* (Werderne.) Byles & G. D. Rowley.** 2009. 103f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

HASEGAWA *et al.* Structure of isoamericanin A, a prostaglandin I₂ inducer, isolated from the seeds of *Phytolacca americana* L. *Chemistry Letters*, n. 2, 329-332, 1987.

HE *et al.* A new triterpenoid saponin from the roots of *Phytolacca acinosa*. *Natural Product Research*, v. 25, n. 18, 2011.

IMPERATO, F. Betanin 3'-sulfate from *Rivinia humilis*. *Phytochemistry*, v. 14, n. 11, p. 2.526-2.527, 1975.

JADOT J, CASIMIR J, LOFFET A. Separation and characterization of 2(S),4(R)-gamma-hydroxy-gamma-methylglutamic acid from *Ledenbergia roseo-aenea* and 2(S),4(R)-gamma-hydroxy-gamma-methylglutamic acid from *Pandanus veitchii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 136, p. 79-88, 1967.

JEONG *et al.* Spinasterol isolated from the root of *Phytolacca americana* and its pharmacological property on diabetic nephropathy. *Planta Medica*, v. 70, n. 8, p. 736-739, 2004.

JERZ *et al.* Separation of betalains from berries of *Phytolacca americana* by ion-pair high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1190, p. 63–73, 2008.

JESUS *et al.* Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlcera e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 19, n. 1A, p. 130-139, Jan./Mar., 2009.

KFFURI, C. W. **Etnobotânica de plantas medicinais no município de Senador Firmino (Minas Gerais).** 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2008.

KHAN *et al.* Acute, subacute and subchronic safety assessment of betalains rich *Rivina humilis* L. berry juice in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, p. 3154–3157, 2011.

KONEMAN *et al.* **Diagnóstico Microbiológico** - Texto e Atlas Colorido. 2a ed. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda. 1993.

LEMOS *et al.* Bactericidal activity of macela (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.) and jaborandi-falso (*Piper aduncum* L.) against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, v. 3, p. 67-72, 2000.

LIMA *et al.* EFEITO DA PROCEDÊNCIA EM ALGUMAS PROPRIEDADES DA MADEIRA DE *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms. *Revista do Instituto Florestal*, v. 22, p. 61-69, 2010.

LUPE, F. A. **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia**. 2007. 120 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, 2007.

MATSUO *et al.* Phaeophytins from cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. *Phytochemistry*, v. 43, n. 2, p. 427-430, 1996.

NAGASHIM *et al.* Clerodane- and halimane-type diterpenoids from the liverwort *Jungermannia hyaline*. *Phytochemistry*, V. 40, p. 209-212, 1995.

NASCIMENTO *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 247-256, 2000.

NOWICKE, J. W. Palynotaxonomic Study of the Phytolaccaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 55, n. 3, p. 294-364, 1968.

OLIVEIRA *et al.* Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 77-82, 2006.

OMS. Cuidados de saúde primários. Organização Mundial de Saúde, 2008. Disponível em: http://www.who.int/whr/2008/whr08_pr.pdf, acesso em 30 de novembro de 2010.

OSTROSKY *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PARKHURST *et al.* Triterpene aglycons from various *Phytolacca dodecandra* populations. *Phytochemistry*, v. 29, n. 4, p. 1.171-1.174, 1990.

PENGEL, S.; SCHAFFNER, W. Acinospesigenin: a new triterpene from the leaves of *Phytolacca acinosa*. *Planta Medica*, v. 56, n. 3, p. 284-286, 1990.

PINO, J. A.; ABREU, O. Volatile compounds from the root of *Agdestis clematidea* Moc. et Sesse ex DC. from Cuba. *Journal of Essencial Oil Research*, v. 20, n. 2, p. 153-155, 2007.

PRANCE, G. T. What is ethnobotany today? *Journal of Ethnopharmacology*, v. 32, p. 209-216, 1991.

RODRIGUES, D. R. **Regeneração de Espécies em Florestas Secundárias**. 2010. 19 f. Projeto (requerimento para coleta e pesquisa) - Unidade de Conservação Parque Estadual Mata São Francisco, 2010.

RIBEIRO *et al.* *Candida albicans* bucais de crianças com síndrome de down: comportamento de tubos germinativos, exoenzimas e sensibilidade a toxinas "killer". *Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS*, v. 22, n. 57, p. 243-249, 2007.

RODRIGUES, E. ESCOLA DE VERAO EM FARMACOGNOSIA, 2011. Natal. Relatório. Natal: Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Acesso em: 07 novembro 2011. Disponível em: http://www.sbfgnosia.org.br/Documentos/Relatorio_EVF2011.pdf

ROMEIRO, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: Editora UFC. 2001.

RISSO, W. E. **Estudo da atividade antinociceptiva e análise exploratória da composição química dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker**. 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

SATO *et al.* Controle de contaminação e oxidação na micropropagação do pau d'alho (*Gallesia gorazema* Moq.). *Agropecuária Técnica*, v. 25, n.2, 2004.

SANTOS *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol Med Lab*, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SCHÄFERHOFF B., MÜLLER K. F. & BORSCH T.: *Caryophyllales* phylogenetics: disentangling Phytolaccaceae and Molluginaceae and description of *Microteaceae* as a new isolated family. *Willdenowia*, v. 39, p. 209–228, 2009.

SHIVA, V. Biopirataria: a pilhagem da natureza e do conhecimento. Petrópolis: Vozes, 2001.

SIANNE *et al.* Phaeophytins from *Tapura fischeri*. *Phytochemistry*, v.49, n. 8, p. 2391-2394, 1998.

SCHOEFS B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, v.13, p.361-371, 2002.

SILVA, J. B. **O papel dos mediadores na (reconstrução da identidade étnica de duas comunidades quilombolas do norte fluminense: Barrinha e Machadinha.** 121 f. Dissertação (mestrado em Sociologia Política) – UENF, Campos dos Goytacazes, 2009.

SIMÕES *et al.* **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

SIMPSON, M. G. Plant systematic. Londres: Elsevier Academic Press, 1953.

SPENGLER, SIGRID; SCHAFFNER, WILLI. **Acinospesigenin: a new triterpene from the leaves of *Phytolacca acinosa*.** *Planta Medica*, v. 56, n.3, p. 284-286,, 1990.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, v. 54, n. 17, p. 4151, 1998.

STRACK *et al.* Humilixanthin, a new betaxanthin from *Rivina humilis*. *Phytochemistry*, v. 26, n. 8, p. 2.285-2.287, 1987.

STRAUSS *et al.* Saponins from root cultures of *Phytolacca acinosa*. *Phytochemistry* , v. 38, n. 4, p. 861-865, 1995.

TAKAHASI *et al.* Structures of 1,4-benzodioxane derivatives from the seeds of *Phytolacca americana* and their neurotogenic activity in primary cultured rat cortical neurons. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 51, n. 12, p. 1.377-1.381, 2003.

VARGAS, L. A. A. **A questão agrária e o meio ambiente: trabalho e educação na Luta pela terra e pela sustentabilidade.** 228 f. Dissertação (mestrado em Educação) - Universidade Federal do Rio De Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, p. 308-313, 2008.

VIEIRA-DA-MOTTA *et al.* RNA III inhibiting peptide (RIP) inhibits agr-regulated toxin production. *Peptides*, v. 22, p. 1621-1627, 2001.

WANG, L. Bioactive Triterpene Saponins from the Roots of *Phytolacca americana*. *Journal of Natural Products*, v. 71, p. 35-40, 2008.

WOO, W. S.; KANG, S. S. Triterpenoids and steroids from seeds of *Phytolacca esculenta*. *Phytochemistry*, v. 24, n. 5, p. 1.116-1.117, 1985.

XIONG *et al.* Chemical constituents from *Phytolacca polyandra*. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*, v. 24, n. 3, p. 401-405, 2002.

YI, Y. A triterpenoid saponin from *Phytolacca esculenta*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 7, 2552-2554, 1992.

YI, Y. Esculentoside L and K: two new saponins from *Phytolacca esculenta*. *Planta Medica*, v. 56, n.3, p. 301-303, 1990.

YI, Y. Lipid components in *Phytolacca acinosa*. *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, v. 25, n.10, p. 585-586, 1990.