



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA E AMBIENTAIS – FCBA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

BRUNA DE PAULA BICUDO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE, COMPOSIÇÃO
QUÍMICA, TOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DAS FOLHAS DE**
Cochlospermum regium

Dourados/MS

13/03/2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA E AMBIENTAIS – FCBA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE, COMPOSIÇÃO
QUÍMICA, TOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DAS FOLHAS DE**
Cochlospermum regium

Bruna de Paula Bicudo

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
para a obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientadora: Kelly Mari Pires de Oliveira

Dourados/MS

13/03/2014

BRUNA DE PAULA BICUDO

“Propriedades antimicrobiana, atividade antioxidante, composição química, citotoxicidade e toxicidade do extrato etanólico da folha de *Cochlospermum regium*”

Aprovado em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Kelly Mari de Oliveira

Universidade Federal da Grande Dourados

Prof^ª. Dr^ª Alexéia Barufatti Grisólia

Universidade Federal da Grande Dourados

Ma. Adriana Araújo de Almeida

Universidade Federal da Grande Dourados

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pela oportunidade da vida. Sua infinita bondade me dá sempre forças e esperança nos momentos mais difíceis da minha caminhada...

A minha mãezinha querida, meu anjo que sempre acreditou em mim e foi a força maior para que eu vencesse todos os meus desafios.

A meu pai adorado (in memoriam), que mesmo não estando presente, iluminou meu caminho incerto.

A meu namorado Diego por me apoiar e estar presente em todos os momentos dessa difícil etapa, por entender meu nervosismo e meus momentos de ausência.

A prof^a Dr^a Andréia Sangalli que me apresentou a planta a ser estudada.

A prof^a Dr^a Kelly Mari Pires de Oliveira, por todo apoio, atenção e orientação neste trabalho. Sua atenção, disponibilidade e ensinamentos permitiram a concretização desse trabalho.

Ao prof. Dr. Jonas pela ajuda com a caracterização química do extrato.

A Adriana pelos ensinamentos no laboratório, sendo muito importante para finalizar minha pesquisa.

A Priscila e ao Bruno pela ajuda e ensinamentos nos testes de mutagenicidade.

Ao Allan por me ajudar com a em todas as fases deste trabalho.

Aos meus amigos Eduardo, Rodrigo e Wirlaine por sempre me ajudarem nessa etapa da graduação e realização desse trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente, participaram comigo na realização deste sonho de vida, incentivando e vibrando por cada conquista, minha eterna gratidão.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Cerrado	3
2.2 Plantas medicinais e princípios ativos	3
2.3 <i>Cochlospermum regium</i>	5
2.4 Perigos associados	6
3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	8
3.1 Objetivo Geral	8
3.2 Objetivos específicos	8
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	9
5. ANEXOS	13
5.1 Artigo	13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato etanólico das folhas de <i>C. regium</i>	21
Tabela 2: Resultados da triagem fitoquímica para o extrato etanólico da folha de <i>Cochlospermum regium</i>	24

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fruto (A) e folhas (B) de *Cochlospermum regium*.....6
- Figura 2:** Perfil cromatográfico e espectros de UV obtido via CLAE analítica do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium*.....26
- Figura 3:** Média do Índice mitótico e Índice de alteração das sementes de *Allium cepa* em resposta ao tratamento descontínuo com extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* submetidas aos tratamentos 0,2; 0,3; 0,5 mg mL⁻¹; CN e CP. *Valores estatisticamente significativos do controle positivo em relação às concentrações pelo teste de Mann-Whitney $p \leq 0,05$. CN: Controle negativo; CP: Controle positivo.....28
- Figura 4:** Índice de germinação das sementes de *A. cepa* em resposta ao tratamento contínuo com o extrato etanólico de folhas de *Cochlospermum regium*, nas concentrações de 0,2; 0,3 e 0,5 mg mL⁻¹, controle negativo (CN) e positivo (CP).....30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

AcOH	Ácido acético
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CAE	Catequina Equivalente
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMR	Comprimento Médio das Raízes
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1 – difenil – 2 picril – hidrazila
HPLC	High-performance Liquid Chromatography
IA	Índice de Alteração
IAC	Índice de Alteração Cromossômica
IC50	Índice de citotoxicidade para 50% da população em estudo
IG	Índice de Germinação
IM	Índice Mitótico
Ø	Diâmetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PI	Percentual de Inibição
UV-vis	Espectroscopia UV/visível
λ	Comprimento de onda

1. INTRODUÇÃO

A bioprospecção pode ser entendida como a exploração e investigação de plantas, animais e micro-organismos para identificação de princípios ativos e ou enzimas utilizadas em diferentes áreas como na indústria farmacêutica e alimentícia, na agronomia entre outras. A bioprospecção também pode ser definida como o estudo da diversidade biológica com fins econômicos e sociais (STROBEL & DAISY, 2003).

O resgate de uso tradicional de plantas é conhecido como estudo etnobotânico e seu uso pela população mundial tem sido muito relevante nos últimos tempos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) mostrou que cerca de 80% da população mundial fez o uso de planta medicinal para tratamento de algum sintoma doloroso ou desagradável, sendo que 30% foi por indicação médica. Desta forma, a OMS recomenda este uso popular como forma de reduzir os custos dos programas de saúde pública (SILVA et al., 2012).

Pesquisas com plantas medicinais e suas propriedades têm proporcionado a produção de medicamentos com custos reduzidos e, conseqüentemente, mais acessíveis à população. Assim, a etnobotânica trabalha em convivência com a etnofarmacologia, que consiste na exploração científica multidisciplinar de agentes biologicamente ativos (LOPEZ, 2006).

A História de plantas medicinais mostra que elas fazem parte da evolução humana sendo utilizadas como os primeiros recursos terapêuticos pelos povos e ainda é a fonte mais procurada pela grande maioria da população. O seu uso é muito frequente em varias regiões do Brasil, incluindo o cerrado que é o segundo maior bioma do Brasil, depois da floresta amazônica, e tem grande potencial econômico, principalmente medicinal (CARVALHO, 2004).

A procura por novas drogas com atividade antimicrobiana tem sido constante preocupação devido ao crescente número de pacientes imunocomprometidos, o ressurgimento de várias infecções que pareciam ter sido controladas e o preocupante aumento da resistência de micro-organismos. Sendo assim, a busca por fitoterápicos no tratamento de muitas doenças é uma das alternativas mais utilizadas nos últimos anos, devido aos bons resultados que estes proporcionam (HÖFLING et al., 2011).

Substâncias antimicrobianas ou antibióticas integram um grupo de agentes terapêuticos, usualmente obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que, em pequenas concentrações, possuem atividade letal ou inibitória contra um grande número

de espécies microbianas, ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro, estabilidade química, entre outras características (AYRES et al., 2008). O conhecimento sobre espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido revisto e ampliado, devido ao crescente número de problemas associados ao uso de antibióticos. Em grande estudo sobre plantas medicinais foi realizada avaliação sobre a atividade antimicrobiana de extratos, óleos essenciais e de substâncias obtidas de espécies vegetais contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (LIMA, 2001).

Ainda que as plantas apresentem ações benéficas, é importante constatar que alguns de seus constituintes podem ser tóxicos ao organismo, e o metabolismo vegetal também pode gerar compostos com esta mesma atividade. Seus efeitos genotóxicos, mutagênicos e fisiológicos no organismo humano necessitam de maiores estudos, e estes estudos têm crescido junto com o aumento do uso terapêutico e com o interesse em comprovar sua eficácia nas mais diversas finalidades farmacológicas (JIMENÉZ et al., 2005).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cerrado

O Brasil possui ampla diversidade de espécies vegetais, sendo que a vegetação se agrupa em seis áreas distintas e de grande abundância de plantas nativas, Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Pradarias, Caatinga e Amazônia. Um dos Biomas de destaque é o Cerrado. O Bioma Cerrado constitui o segundo maior bioma brasileiro ocupando área de aproximadamente 2 milhões de km², o que corresponde a cerca de 24% do território nacional (KLINK & MACHADO, 2005).

De acordo com Sano *et al.* (2007), 61% da cobertura vegetal natural do cerrado corresponde à vegetação savânica, 32% formação florestal e 7% formação campestre. O cerrado apresenta elevada riqueza de espécies, com plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós, totalizando 11.627 espécies vasculares nativas (MENDONÇA *et al.* 2008).

O cerrado apresenta grande diversidade de espécies utilizadas na medicina popular, em função de características morfológicas, como xilopódios e cascas, que acumulam reservas e assim possuem substâncias farmacologicamente ativas. Esse bioma apresenta grande diversidade de ordem, famílias e gêneros, e quanto maior for a diversidade taxonômica em níveis superiores, maior é o distanciamento filogenético entre as espécies e maior é a diferença e a diversidade química entre elas, despertando maior interesse e importância em pesquisas com espécies vegetais utilizadas como medicinais (CONCEIÇÃO *et al.*, 2011).

É reconhecido mundialmente como um dos 25 “hotspots”, tem grande parte da sua flora composta por espécies endêmicas, o que lhe confere o título de savana mais diversificada do mundo (SANO *et al.*, 2007). Há uma diversidade de plantas do Cerrado que têm sido estudadas por suas potencialidades terapêuticas e dentre estas merecem destaque por suas propriedades antimicrobianas: *Casearia sylvestris* Sw, *Rosmarinus officinalis* L, *Tabebuia avellanadae* (HÖFLING *et al.*, 2011), *Schinus molle*, *Schinus terebinthifolius*, *Origanum vulgare*, entre outras (SHIMIZU *et al.*, 2006). O Cerrado tem inúmeras espécies de plantas com potenciais medicinais que ainda não foram estudadas.

2.2 Plantas medicinais e princípios ativos

O Brasil possui a maior diversidade vegetal do mundo e a utilização das plantas medicinais, no tratamento de doenças, apresenta como base influências das

culturas indígena, africana e europeia. Essas influências marcaram as diferentes áreas da cultura brasileira no aspecto material, constituindo a base da medicina popular que vem sendo retomada pela medicina natural. Planta medicinal pode ser definida como toda e qualquer planta que serve de alguma maneira, para o tratamento de um problema de saúde, tendo efeito definido sobre doenças e sintomas e com eficácia comprovada cientificamente (CONCEIÇÃO et al., 2011).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que os extratos vegetais ou seus princípios ativos são usados na medicina popular em terapias tradicionais por 80% da população mundial (BHALODIA & SHUKLA, 2011). No Brasil, a quantidade de informações sobre plantas medicinais cresceu apenas 8% anualmente durante os últimos 20 anos. Isto demonstra que, num país biologicamente tão rico e com ecossistemas tão ameaçados, pesquisas com plantas medicinais devem ser estimuladas, uma vez que podem levar à reorganização do uso dos recursos naturais, tendo em vista a necessidade de a sua extração estar associado à manipulação de plantas (PEREIRA et al., 2009).

A utilização de extratos de plantas, bem como outras formas de tratamentos médicos alternativos, vem ganhando grande popularidade desde a década de 1990. Os motivos para este ressurgimento incluem redução das novas drogas antimicrobianas no setor farmacêutico, aumento na resistência aos antibióticos, e a necessidade de tratamentos para novos patógenos emergentes (JUNIOR et al., 2009).

As propriedades terapêuticas das plantas medicinais são os princípios ativos que elas contêm para o seu uso em diferentes doenças. Esses princípios ativos são os metabólitos primários e secundários (WINK, 2008).

Os metabólitos primários de uma planta são substâncias produzidas necessárias às funções básicas vitais como crescimento celular, respiração, fotossíntese, estocagem e reprodução (FUMAGALI et al., 2008). Metabólitos secundários são substâncias produzidas em pequenas quantidades, mas, nem sempre estão envolvidos em funções vitais do vegetal ou mesmo presentes em todos eles como nos produtos do metabolismo primário. Caracterizam-se por apresentarem baixo peso molecular e possuírem características químicas variadas e às vezes complexas (ALVES, 2001).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas contêm compostos cuja função é proteção contra herbivoria e ataque de patógenos, além de beneficiá-las na competição com outros vegetais, também protegem o vegetal de influências externas, como temperatura, umidade, exposição à luz ultravioleta e deficiência de nutrientes minerais (ALVES, 2001).

Experimentos demonstraram que muitos metabólitos secundários como os alcaloides, glicosídeos cianogênicos, terpenos, saponinas, taninos, antraquinonas são aleloquímicos com características adaptativas e que têm se diversificado durante a evolução pela seleção natural a fim de proteger as plantas contra vírus, bactérias, fungos, plantas concorrentes e contra os herbívoros (WINK, 2003).

Existem formas de preparo e uso mais adequados, para a utilização e extração dos princípios ativos de uma planta, para cada parte a ser utilizada, ou doença a ser tratada, pois assim, os efeitos colaterais serão poucos na utilização dos fitoterápicos, desde que utilizados na dosagem correta (ARNOUS et al., 2005).

2.3 *Cochlospermum regium*

Cochlospermum regium popularmente conhecido como algodãozinho-do-cerrado ou algodãozinho-do-campo, faz parte da família Cochlospermaceae, é uma planta nativa do cerrado, ocorre em regiões tropicais como América, África e Austrália. Embora esta espécie tenha sido considerada como exclusivamente brasileira, foi localizada também no Paraguai e Bolívia, nas localidades de Amambai e Santa Cruz (LIMA et al, 1995).

No Brasil, *C. regium* é comum na vegetação do cerrado e campos da Amazônia, onde é considerada como planta forrageira, ornamental e medicinal. Demonstra resistência à queimadas e ao pastejo sobrevivendo nas leiras em solo arenoso, no entanto, é considerada em perigo de extinção pelo governo do Estado do Paraná, entrando na lista de espécies medicinais ameaçadas, divulgada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (SOUZA & LORENZI, 2008; POTT & POTT, 1994).

A planta é um subarbusto de até 2 m de altura, os ramos variam de 0,8 a 1,8 m de comprimento, apresenta caule ferrugíneo e nodoso, ramos castanho-avermelhados e acinzentados, folhas alternadas e sistema subterrâneo robusto e lenhoso (MENDONÇA et al., 1998; DURIGAN et al., 2004). As flores são ígneo-fulvas ou amarelas e medem de 6 a 8 cm de diâmetro, dispostas em panículas terminais, contendo de 5 a 10 flores, localizadas na extremidade de brotos grossos e totalmente despidos de folhas (NORONHA & GOTTSBERGER, 1980). O fruto é uma cápsula deiscente ovóide ou elipsoide, medindo cerca de 6 cm, tendo as sementes envoltas em filamentos compridos e lanosos. As raízes são tuberosas por causa da abundância de tecido parenquimático de reserva, o qual é permeado pelo tecido vascular (MENDONÇA et al., 1998) (Figura 1).

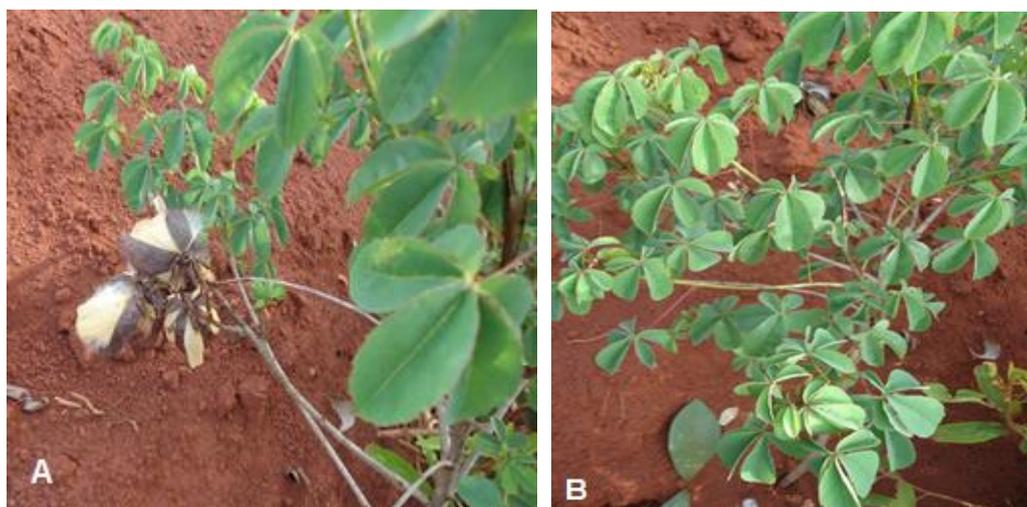


Figura 1: Fruto (A) e folhas (B) de *Cochlospermum regium*.

Fonte: Acervo pessoal.

C. regium possui propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antibacterianas, antiedematogênicas e tem sido extensivamente utilizada na medicina popular para o tratamento de gastrite, úlceras, inflamação, infecção e artrite reumatóide. As raízes contêm compostos triterpenóides, flavonóides, saponinas, taninos e compostos fenólicos (OLIVEIRA et al. 1996; SIQUEIRA et al. 1994; CORREA, 1975).

Um estudo recente caracterizou o extrato hidroetanólico da raiz de *C. regium* pela presença de flavonoides, triacilbenzenos e derivados de ácido gálico, fornecendo apoio para justificar o uso popular desta espécie no tratamento infecção (SOLON et al, 2012). Estudos *in vitro* demonstraram a citotoxicidade do extrato da raiz contra as células CHO-K1 não-tumorigênicas (CESCHINI & CAMPO, 2006). Além disso, *C. regium* não exibiu efeitos antimutagênicos quando avaliados na medula óssea de camundongos (ANDRADE et al, 2008).

2.4 Perigos associados

Existem poucos estudos, apesar da crescente importância dos fitoterápicos, que comprovem a eficácia e a segurança das plantas medicinais. Entre os constituintes químicos das plantas, muitas substâncias podem ser nocivas para a saúde humana, sendo algumas muito tóxicas. Este conhecimento contradiz a falsa ideia de que drogas naturais, preparadas por produtos derivados de plantas, são seguras e isentas de efeitos adversos (CALIXTO, 2000).

As plantas sempre foram usadas como fonte comum de medicamentos, tanto em remédios tradicionais, quanto de produtos industrializados. Estima-se que mais de 80% da população mundial utiliza plantas como a sua fonte primária de agentes

medicinais. A flora brasileira foi estimada como a maior no mundo, e no país as plantas sempre foram usadas para efeitos preventivos e tratamento de doenças. Devido a isso, é extremamente importante que os testes de genotoxicidade destas preparações sejam feitos para avaliar o seu potencial mutagênico ou modulação da genotoxicidade, quando relacionado com outras substâncias (ANDRADE et al., 2008).

As plantas produzem grande variedade de substâncias tóxicas, alguns em quantidades significativas, como defesa contra micro-organismos (bactérias, fungos, insetos e vírus) e animais. O uso indiscriminado de plantas medicinais, muitas das quais são tóxicas, podem ter riscos para a saúde porque a dose limiar existe para cada planta medicinal assim como para produtos farmacêuticos sintéticos (ALMEIDA, 1993).

As substâncias mutagênicas podem causar danos celulares aos organismos vivos que estão frequentemente expostos a estas, danos que geralmente são induzidos por agentes físicos, químicos ou biológicos que acabam afetando processos como a transcrição e duplicação gênica e alterações cromossômicas, o que pode levar a processos cancerosos e morte celular. As substâncias que causam lesões nos materiais genéticos são conhecidas como genotóxicas (POLETTTO et al., 2011). Um teste que se destaca para avaliação de mutagenicidade é o teste com cebola (*Allium cepa*), suas raízes ficam em contato direto com a substância testada, o que permite a avaliação de toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade em diferentes concentrações. As alterações cromossômicas e as da divisão das células meristemáticas da raiz de cebola são usadas para alertar a população sobre o consumo do fitoterápico (STANGE et al., 2009).

Os estudos toxicológicos são realizados para se avaliar os efeitos tóxicos que as plantas podem conter e mostrar que apesar de serem naturais, os produtos fitoterápicos não são isentos de efeitos tóxicos ou adversos, e que o uso popular de plantas medicinais serve como validação da eficácia destes medicamentos (CUNHA et al., 2009).

3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante, identificar os principais metabólitos secundários e os potenciais efeitos tóxico e citotóxico do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a ação do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* frente a bactérias e leveduras de interesse clínico.
- Quantificar os principais metabólitos secundários presentes no extrato etanólico de *Cochlospermum regium*.
- Avaliar a mutagenicidade, citotoxicidade e toxicidade do extrato etanólico da folha de *Cochlospermum regium* em *Allium cepa*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, E.R. Plantas medicinais brasileiras – conhecimentos populares e científicos. **Editora Hemum Ltda**, São Paulo, p. 333, 1993.
- ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos temáticos de química nova na escola**, v. 3, p. 10-15, 2001.
- ANDRADE, L.S. et al. Absence of antimutagenicity of *Cochlospermum regium* (Mart. and Schr.) Pilger 1924 by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 155-159, 2008.
- ARNOUS, A.H.; SANTOS, A.S.; BEINNER, R.P.C. Plantas medicinais de uso caseiro - Conhecimento popular e Interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.
- AYRES, M.C.C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos de raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, 2008.
- BHALODIA, N.R.; SHUKLA, V.J. Antibacterial and antifungal actives from leaf extracts of *Cassia fistula* I: An ethnomedicinal plant. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, p. 104-109, 2011.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.
- CARVALHO, A.R. Popular use, chemical composition and trade of cerrado's medicinal plants (Goiás, Brazil). **Environment, Development and Sustainability**, v. 6, p. 307-316, 2004.
- CESCHINI, L.; CAMPOS, E. G. Cytotoxic effects of *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger aqueous root extract on mammalian cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 302-305, 2006.
- CONCEIÇÃO, G. M. et al. Plantas do cerrado: comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí. **Scientia Plena**, v. 7, n. 12, 2011.

CORREA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, p. 747. Imprensa Nacional (Ministério da Agricultura, Ind. e Comércio), Rio de Janeiro, v. 6, p.777, 1975.

CUNHA, L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 403-411, 2009.

DURIGAN, G. et al. Plantas do cerrado paulista: imagens de uma paisagem ameaçada. São Paulo: Ed. Paginas & Letras, 2004.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

HÖFLING, J. F. et al. Evaluation of Antifungal Activity of Medicinal Plant Extracts Against Oral *Candida albicans* and Proteinases. **Mycopathology**, v. 172, n. 8, p. 117-124, 2011.

JIMENÉZ, M. R. et al. Genotoxicity and antigenotoxicity of some traditional medicinal herbs. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 585, p. 147- 155, 2005.

JUNIOR, I.F.S. et al. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1, p. 242-248, 2009.

KLINK, C.A.; MACHADO, R. B. A conservação do cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, p. 147-155, 2005.

LIMA et al. Metabólitos secundários de *Cochlospermum regium*. **Fitoterapia**, v. 66, p. 545-46, 1995.

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

LOPEZ, C.A.A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. *Ambiente, Gestão e Desenvolvimento*, v. 1, n. 1, p. 19-27, 2006.

MENDONÇA, R.C. et al. Flora vascular do Bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. Cerrado: ecologia e flora. Planaltina-DF: **Embrapa Cerrados**, p. 421-442, 2008.

MENDONÇA, R.C. et al. Flora vascular do cerrado. In SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. Cerrado: ambiente e flora. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p. 289-556, 1998.

NORONHA, M.R.P.; GOTTSBERGER, G.A polinização de *Aspilla floribunda* (Asteraceae) e *Cochlospermum regium* (Cochlospermaceae) e a relação das abelhas visitantes com outras plantas do cerrado de Botucatu, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 3, p. 67-77, 1980.

OLIVEIRA, C.C. de; SIQUEIRA, J.M. de; SOUZA, K.C.B.; RESENDE, U.M. Antibacterial activity of rhizomes from *Cochlospermum regium* preliminary results. **Fitoterapia**, v.67, n.2, p.176-177, 1996.

PEREIRA, Z.V. et al. Medicinal plants used by Ponta Porã community, Mato Grosso do Sul State. Acta Scientiarum. **Biological Sciences**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 293-299, 2009.

POLETTI, P.O. et al. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (Mart. Ex Benth. J. F. Macbr: Fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*. **Revista Pesquisa & Criação**, v. 10, n. 1, p. 163-175, 2011.

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do pantanal**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal. Corumbá: EMBRAPA, 1994.

SANO, E.E. et al. **Mapeamento de cobertura vegetal do bioma cerrado: estratégias e resultados**. Embrapa Cerrados. Planaltina, Brasília, DF. p. 30, 2007.

SHIMIZU, M.T. et al. Essential oil of *Lithraea molleoides* (Vell.): chemical composition and antimicrobial activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 556-560, 2006.

SILVA, S. M. F. Q. et al. Atividade in vitro de extratos brutos de duas espécies vegetais do cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 6, p. 1649-1656, 2012.

SIQUEIRA, J.M., et al. Flavanona do extrato hidroalcoólico de *Cochlospermum regium* (MART. and SCH.) Pilger (algodãozinho-do-campo). **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Fortaleza, 1994.

SOLON, S. et al. Phenolic derivatives and other chemical compounds from *Cochlospermum regium*. **Química Nova**, v. 35, p. 1169-1172, 2012.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado par identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil baseado em APG II. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

STANGE, V. S.; GOMES, T. D. U. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. C. P. Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto, por meio de bioensaios *in vivo* e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), Cecropiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2B, p.637-642, 2009.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n.4, p.91-502, 2003.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n.1, p.3-19, 2003.

WINK, M. Evolutionary advantage and Molecular Modes of Action of Multi Component Mixtures Used in Phytomedicine. **Current Drug Metabolism**, v.9, n.10, p.996-1009, 2008.

5. ANEXOS

5.1 Artigo

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DAS FOLHAS DE *Cochlospermum regium*

XXXXXXXXX¹, XXXXXXXX², XXXXXXXX³

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais. Universidade Federal da Grande Dourados. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul.

Rodovia Dourados – Itaum Km 12. 798000-000 Dourados MS.

RESUMO

O estudo de plantas medicinais representa fonte importante para o tratamento de diversas doenças, incluindo as infecções fúngicas e bacterianas. *Cochlospermum regium* (Cochlospermaceae) popularmente conhecida como algodãozinho-do-cerrado, é uma planta amplamente utilizada na medicina no Brasil. Entre as várias propriedades medicinais atribuídas à planta, destaca-se seu uso para o tratamento de doenças de etiologia infecciosa e inflamações. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante, os principais metabólitos secundários e os potenciais efeitos tóxico e citotóxico do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium*. A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. A ação antioxidante foi determinada com o ensaio de radical livre DPPH. Para determinar a composição química do extrato foi realizada a cromatografia líquida de alta eficiência. Os possíveis efeitos tóxico e citotóxico foram avaliados pelo teste com *Allium cepa*. O extrato etanólico da folha apresentou ação frente à *Candida krusei* ($64\mu\text{g mL}^{-1}$), *Enterococcus faecalis* ($4\mu\text{g mL}^{-1}$) e *Escherichia coli* ($8\mu\text{g mL}^{-1}$). A atividade antioxidante apresentou IC₅₀ de $18,67\ \mu\text{g mL}^{-1}$. A prospecção fitoquímica indicou presença de flavonóides, fenóis, taninos. Os resultados demonstraram que as concentrações testadas não causaram toxicidade, sugerindo que o extrato de *C. regium* não interfere na divisão celular. Esse trabalho demonstrou a atividade antimicrobiana e antioxidante de *C. regium* e ausência de toxicidade, indicando suas potencialidades para o desenvolvimento de novas terapias no tratamento de infecções.

Palavras-chave: *Cochlospermum regium*, cerrado, propriedades medicinais.

ABSTRACT

The study of medicinal plants is important for the treatment of various diseases source, including fungal and bacterial infections. *Cochlospermum regium* (Cochlospermaceae) popularly known as algodãozinho-do-cerrado, is a plant widely used in medicine in Brazil. Among the various medicinal properties attributed to the plant, there is its use for the treatment diseases of infectious etiology and inflammation. The aim of this work was to evaluate the antimicrobial, antioxidant, key secondary metabolites and potential toxic and cytotoxic effects of the ethanol extract of the leaves of *Cochlospermum regium*. The antimicrobial activity was performed by the microdilution broth method. The antioxidant activity was determined with the DPPH free radical assay. To determine the chemical composition of the extract to high performance liquid chromatography was performed. Possible toxic and cytotoxic effects were evaluated by testing with *Allium cepa*. The ethanolic leaf extract showed activity against *Candida krusei* ($64\mu\text{g mL}^{-1}$), *Enterococcus faecalis* ($4\mu\text{g mL}^{-1}$) and *Escherichia coli* ($8\mu\text{g mL}^{-1}$). The antioxidant activity showed an IC₅₀ of $18,67\ \mu\text{g mL}^{-1}$. The phytochemical screening indicated the presence of flavonoids, phenols, tannins. The results showed that the tested concentrations did not cause toxicity, suggesting that the extract of *C. regium* does not interfere with cell division. This study demonstrated the antimicrobial and antioxidant activity of *C. regium* and absence of toxicity, indicating their potential for the development of new therapies for the treatment of infections.

Keywords: *Cochlospermum regium*, Cerrado, medicinal properties.

1. INTRODUÇÃO

Cochlospermum regium (Cochlospermaceae), popularmente conhecido como algodãozinho-do-cerrado, algodãozinho-do-campo, é encontrado na região de cerrado em áreas tropicais como América, África e Austrália (LIMA et al., 1995). O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, depois da Amazônia, com mais de 7.000 espécies de plantas vasculares. Devido à sua flora diversificada, tem aumentado o interesse em pesquisas sobre plantas medicinais endêmicas do Cerrado como fonte de compostos bioativos (VIOLANTE et al., 2012).

A infusão de suas folhas, e principalmente das raízes tem sido extensivamente utilizada na medicina popular para o tratamento de gastrite, úlceras, inflamação, artrite reumatoide, infecção do útero e ovário, entre outras doenças (OLIVEIRA et al. 1996,

SIQUEIRA et al. 1994, CORREA, 1975). Dentre as plantas medicinais indicadas como anti-inflamatórias por raizeiros da região de Goiânia-GO, o algodãozinho obteve o maior número de citações, onde os pesquisados citaram a utilização do sumo das sementes, folhas, flores após infusão, e ainda a raiz em decocção (SANTOS et al., 2004).

Pesquisas anteriormente realizadas com as raízes de *C. regium* evidenciaram propriedades anti-inflamatórias (PIO CORRÊA, 1975), antibacterianas (OLIVEIRA et al, 1996), analgésicas e antiedematogênicas (SIQUEIRA et al. 1994). Além disso, estudos demonstraram que as raízes possuem boa atividade para o tratamento de úlcera (LEWIS & HANSON, 1991), dermatite e artrite reumatoide (PIO CORRÊA, 1975). As raízes de *C. regium* contêm compostos triterpenóides, flavonóides, saponinas, taninos e compostos fenólicos (RITTO, 1996). Contudo, ainda são escassos os estudos que determinam as propriedades medicinais das folhas de *C. regium*.

No Brasil, o uso de medicamentos fitoterápicos está aumentando com taxa de 20% ao ano, após a reavaliação do uso de plantas medicinais para o tratamento de várias doenças (PETROLINI et al., 2012). Mesmo com o desenvolvimento de antibióticos, infecções bacterianas e fúngicas ainda constituem questão importante na medicina, e a presença de numerosas cepas resistentes aos medicamentos representa um novo desafio às pesquisas. Medicamentos à base de plantas têm sido amplamente utilizados no campo da medicina por muitos séculos. Recentemente, tem aumentado o interesse em produtos naturais, devido a sua disponibilidade, menos efeitos colaterais ou toxicidade, bem como melhor biodegradabilidade, em comparação com os antibióticos disponíveis e conservantes (BENLI et al., 2007).

Estudos têm demonstrado a possibilidade de antioxidantes comerciais utilizados na indústria alimentícia apresentarem alguns efeitos tóxicos (CETINUS et al., 2007; MOURE et al., 2001; SOUSA et al, 2007). Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles (SOUSA et al, 2007).

Apesar das profundas vantagens terapêuticas apresentadas por algumas plantas, como ajuda no combate a doenças infecciosas, disfunções metabólicas, doenças alérgicas e traumas diversos, entre outros, alguns constituintes de plantas medicinais podem ser potencialmente tóxicos, cancerígeno e teratogênico (AKINBORO & BAKARE, 2007). Determinados compostos dos extratos vegetais podem causar doenças e até a morte por ação de agentes naturais mutagênicos e carcinogênicos, justificando o interesse em determinar os riscos no uso medicinal desses extratos (LUZ et al., 2012).

Devido à ampla utilização da raiz do algodãozinho-do-cerrado pela população, e aos poucos estudos sobre as propriedades das folhas, bem como a necessidade de se encontrar fármacos que não ofereçam risco à saúde humana, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante, os potenciais efeitos tóxico e citotóxico e os principais metabólitos secundários do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

As folhas de *Cochlospermum regium* foram coletadas em uma região de cerrado, localizada na Fazenda Santa Madalena, Rodovia Dourados – Itahum, Km 12, S 22° 13' 41.8'' / W 054° 49' 58.4'', Dourados – MS, durante o mês de dezembro de 2012. A exsicata foi identificada pela Prof. Dra. Zefa Valdivia Pereira e depositadas no o Herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS sob a identificação DDMS 5001.

2.2 Obtenção do extrato etanólico

As folhas de *C. regium* foram secas em estufa de ar circulante à temperatura de 30°C por sete dias e após a secagem o material foi pulverizado em moinho de facas, pesado e armazenado em local seco sem umidade.

O material botânico seco e pulverizado foi misturado em 1000 mL de álcool etílico absoluto a 95% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda) e deixados à temperatura de 25°C por 48 h, com agitações ocasionais. Após ser filtrado, o extrato vegetal da folha foi completamente evaporado à 35°C, em rota-evaporador (Rotaevaporador R – 215) e liofilizado (liofilizador E-C MicroModulyo) acoplado a bomba de vácuo (valuPump VLP80 Savant). O extrato etanólico liofilizado foi mantido sob refrigeração até ser utilizado para os testes biológicos.

2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato

A Concentração Inibitória Mínima do extrato foi determinada por meio de técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008).

Os micro-organismos testados são provenientes da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA): *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida krusei* ATCC 6558, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. As leveduras foram armazenadas em caldo Sabouraud Dextrose (Difco) com 20% de glicerol e as bactérias em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Himedia) com 20% de glicerol e mantidos em freezer -80°C. A ATCC *P. aeruginosa* foi armazenada em ágar nutriente (Himedia) e mantida em temperatura de 8°C.

O extrato etanólico foi dissolvido em Dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma-Aldrich) e foram realizadas diluições em série com o caldo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) para leveduras e caldo Müller Hinton (Himedia) para bactérias. As concentrações foram distribuídas em placas de microdiluição com 96 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark), com concentração inicial de 2048 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e concentração final de $\mu\text{g mL}^{-1}$. Logo após, foi adicionado 100 μL do inóculo na concentração de 0,5 de McFarland (10⁸ UFC mL⁻¹) nos poços. As placas de microdiluição foram incubadas a 35°C por 48 horas (para leveduras) e 37°C por 24 horas (para bactérias). Para controle positivo foram utilizados Fluconazol (antifúngico convencional) e ampicilina (antibiótico). A CIM foi considerada como a menor concentração do extrato no qual os micro-organismos não apresentaram crescimento visível após incubação (PANGHAL et al., 2011). O teste foi realizado em duplicata.

2.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

As amostras foram removidas de cada poço (10 μL) da placa de microdiluição do CIM e perfuradas em uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Difco) para avaliação da ação fungicida e para avaliação bactericida foram perfuradas em uma placa de Petri contendo ágar Müeller Hinton (Himedia). As placas foram incubadas durante 48 horas a 35°C para avaliação fungicida e durante 24 horas a 37°C para avaliação bactericida. A CFM e CBM foram definidas como a menor concentração que não houve crescimento de colônias (BAGIU et al., 2012).

2.5 Ensaio antioxidante com o radical livre DPPH

O teste antioxidante com o radical livre DPPH (1,1 – difenil – 2 picril – hidrazila) foi realizado na amostra empregando solução preparada de DPPH a 0,004% em metanol. A amostra foi analisada empregando diferentes concentrações de 0,2 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A cada 0,5 mL da solução preparada foram adicionados 1 mL da solução de DPPH. Para o branco foi utilizado o solvente de solubilização das amostras (etanol). Através das absorbâncias foi calculado o percentual de inibição (PI) (MOKBEL & HASHINAGA, 2006). As concentrações e o PI foram empregados para obter o (IC50) de cada amostra. Todos os testes foram realizados em triplicata e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Biospectro) no comprimento de onda de 517 nm.

2.6 Triagem fitoquímica

Foram realizados testes para rastrear as seguintes classes de substâncias: alcalóides (WALL et al.,1954, COSTA, 1982), esteroides e triterpenóides (WALL et al.,1954), flavonoides (WALL et al.,1954), ácidos orgânicos (MERCK, 1980), fenóis e taninos (WALL et al.,1954).

Considerando que os compostos fenóis, flavonóides e taninos apresentaram maiores concentrações este foram quantificados. Para calcular a concentração de flavonóides foi preparada uma curva analítica (2,5-125,0 μg) empregando a quercetina como padrão, para fenóis foi preparada uma curva analítica (1,0- 40,0 μg) empregando o ácido gálico como padrão e a quantificação de taninos condensados foi feita por meio de curva de calibração externa (1,0-20,0 μg), empregando-se a catequina como padrão. O procedimento experimental realizado com o padrão foi o mesmo utilizado para as amostras. Com estes dados foi feita a regressão linear e foi obtida a equação da reta, a qual teve seus dados empregados no cálculo das amostras reais. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.7 Análise do extrato via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detector de arranjo de diodos (DAD)

O extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* foi analisado no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) modelo: VARIAN 210, detector de arranjo de diodos (DAD), com varredura entre 200-800 nm. Coluna supelco C-18 (\emptyset

4,6 mm x 250 mm, diâmetro da partícula 10 µm) e pré-coluna (25 mm x 3 mm) de mesma fase da coluna. Sistema eluente gradiente metanol/AcOH 6% e acetato de sódio 2 mM de 5 a 15% de metanol (v/v) até 45, de 15% a 30% de metanol (v/v) até 55, de 30% a 50% de metanol (v/v) até 60, de 50% a 100% de metanol (v/v) até 65 mais 5 minutos para retornar a condição inicial. Vazão de fluxo da bomba de 1 mL/min e volume injetado de 5 µL, λ 325 nm. As amostras foram filtradas com um micro-filtro de 0,45 µm.

Foram injetados 14 padrões nas mesmas condições da amostra, os padrões utilizados foram ácido rosmarinico, ácido caféico, carnosol, ácido ferulico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido siringico, vanilina, ácido sinápico, luteolona, apigenina, rutina, caempferol e quercetina.

2.8 Teste de *Allium cepa*

2.8.1 Avaliação de toxicidade

Para a avaliação de efeitos de toxicidade submeteu-se sementes de *Allium cepa* ao tratamento contínuo e o parâmetro analisado foi o comprimento médio das raízes das sementes (CMR) e o índice de germinação (IG). Para isso, foram distribuídas de 50 a 100 sementes de *Allium cepa*, do tipo baia periforme, em placas de Petri de vidro (100 x 15 mm) tendo como substrato uma folha de papel-filtro umedecida com diferentes concentrações do extrato de *Cochlospermum regium* (0,2; 0,3 e 0,5 mg mL⁻¹), permanecendo por 5 dias em temperatura ambiente. Para controle negativo (CN) as sementes germinaram em água destilada e no controle positivo (CP) em Ciclofosfamida 0,1% (Baxter). As raízes foram medidas com auxílio de uma régua. O CMR foi determinado pela média do tamanho das raízes para cada uma das amostras e o IG pela média de raízes germinadas por dia em cada tratamento.

2.8.1 Avaliação da citotoxicidade

Para avaliação de citotoxicidade submeteu-se sementes de *Allium cepa* ao tratamento descontínuo. Foram distribuídas de 50 a 100 sementes de *Allium cepa*, do tipo baia periforme, em placas de Petri de vidro (100 x 15 mm) tendo como substrato uma folha de papel-filtro umedecida com água destilada à temperatura ambiente por 4 a 5 dias. Quando as raízes alcançaram 2 a 4 cm de comprimento, essas foram tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de *Cochlospermum regium* (0,2; 0,3 e

0,5 mg mL⁻¹). Para controle negativo (CN) as sementes germinaram em água destilada e no controle positivo (CP) em Ciclofosfamida 0,1% (Baxter). Após 24 horas, as raízes de *A. cepa* foram coletadas e fixadas em Carnoy. Para montagem das lâminas as raízes de *A. cepa* foram coradas com Reativo de Schiff e Carmim acético 2%, cobriu-se com uma lamínula e pressionou-se suavemente a lâmina e a lamínula envolvidas por um papel filtro e observou-se em microscópico. As lâminas foram confeccionadas utilizando-se as pontas das raízes das sementes germinadas nas diferentes concentrações, referente ao extrato analisado e seus controles.

A análise da atividade citotóxica consta em realizar a investigação de anormalidades cromossômicas (AC) e o índice mitótico (IM) nas células de raízes das sementes de *A. cepa*, foram analisadas 5 lâminas por tratamento, contadas 1000 células por lâmina, totalizando 5000 células por tratamento.

2.9 Análise estatística

Para a comparação dos resultados dos testes de toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade entre os grupos experimentais foi utilizado o teste de Mann-Whitney pelo programa Bioestat. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato

Considera-se que se a atividade do extrato testado no CIM for inferior a 100µg mL⁻¹, sua atividade antimicrobiana será avaliada boa, se a atividade antimicrobiana for de 100 a 500µg mL⁻¹ é considerada mediana, a partir de 500 a 1000µg mL⁻¹ a atividade antimicrobiana é considerada fraca; e mais de 1000µg mL⁻¹ a ação do extrato é considerada inativa (ARAÚJO et al., 2011; HOLETZ et al., 2002).

Com base nesses critérios, o extrato etanólico da folha *Cochlospermum regium* obteve bom resultado frente aos micro-organismos estudados, apresentando boa ação frente à *Candida krusei* (64µg/mL), *Enterococcus faecalis* (4µg mL⁻¹) e *Escherichia coli* (8µg/mL); efeito médio frente à *Staphylococcus aureus* (512µg mL⁻¹) e ação inativa à *Candida glabrata* (1024µg mL⁻¹). Porém não obteve efeito frente à *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato etanólico das folhas de *C. regium*.

Micro-organismos	<i>Cochlospermum regium</i> (folha)		Ampicilina*	Fluconazol*
	CIM	CFM/CBM	CIM	CIM
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	-	-		1
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	1024	2048		32
<i>Candida krusei</i> ATCC 6558	64	512		16
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	-	-		2
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	4	4	1	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8	-	8	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	1	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	512	-	128	

* antibiótico e antifúngico padrão recomendado pelo CLSI.

C. krusei foi a espécie que obteve melhor resultado entre as leveduras avaliadas. Esta levedura tem grande relevância médica e demonstra resistência intrínseca ao fluconazol que é considerado antifúngico padrão e é um dos mais receitados pelos médicos, além disso, apresenta baixa sensibilidade para anfotericina B e a 5-fluorocitosina (SCOTTI et al., 2012, YAN et al., 2012). *Candida krusei* tem-se mostrado como um patógeno hospitalar ocasional, particularmente, em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplante de medula óssea (IWEN et al., 1995). Alguns autores relataram aumento da ocorrência de fungemias causadas por *C. krusei* em pacientes neutropênicos expostos ao tratamento prolongado por fluconazol (WINGARD, 1995).

O resultado obtido em nosso estudo para *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* foi considerado bom, pois são bactérias Gram negativas, cuja estrutura da parede celular favorece maior resistência aos antimicrobianos (SUFFREDINI et al., 2007).

Enterococcus faecalis surgiu como um patógeno nosocomial responsáveis por infecções do trato geniturinário, bacteremia, infecções de feridas, endocardite e infecções pele e tecidos flexíveis (ELSNER et al., 2000; GRAY & PEDLER, 1992; MORRISON & WENZEL, 1986). O tratamento de infecções causadas por *E. faecalis* é

um desafio devido à sua resistência intrínseca a vários antibióticos. Esta resistência se tem destacado pelo rápido declínio no número de opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções causadas por esta espécie bacteriana (HARBARTH et al., 2002).

Escherichia coli é uma das principais causas de doenças infecciosas em seres humanos e é o agente etiológico mais frequente das infecções do trato urinário (ITUs), acometendo principalmente mulheres e crianças (KAPER et al., 2004). Morbidade por infecções do trato urinário adquiridas na comunidade é alta e o uropatogêno mais comum é a *Escherichia coli*, e o tratamento inicial da doença é geralmente empírico (FOXMAN & BROWN, 2003). A resistência adquirida pela bactéria *E. coli* se deve a utilização inadequada de antimicrobianos e a administração em doses sub-terapêuticas, isto faz com que somente os agentes bacterianos mais resistentes sejam selecionados, e não contêm a infecção (FERREIRA & KNÖBL, 2000).

As CIMs do extrato etanólico da folha de *C. regium* foram consideradas boas para os micro-organismos testados, pois os valores das concentrações que inibiram foram muito menores comparados ao estudo realizado Silva et al. (1996) com uma espécie do gênero *Cochlospermum*. Estes autores relatam que a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da raiz de *Cochlospermum tinctorium* apresentou CIMs para *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* de $>25 \text{ mg mL}^{-1}$, 3.13 mg mL^{-1} e 6.25 mg mL^{-1} , respectivamente.

Violante et al. (2012) relataram atividade antimicrobiana contra *Candida krusei* dos extratos etanólico de *Roupala brasiliensis* com CIM de $31,3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, *Hyptis crenata* e *Protium heptaphyllum* com CIM de $125 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. As frações de diclorometano e acetato de etila obtidas de *H. crenata* apresentaram CIM= $62,5$ e $31,3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente e a fração de diclorometano *R. brasiliensis* (CIM = $62,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) contra *Enterococcus faecalis*, indicando que o extrato estudado apresenta boa atividade antimicrobiana. Pereira et al (2012) testou frações do extrato de *Morus alba* e observou que *E. coli* foi sensível à fração acetato de etila na concentração de $256 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (CIM), *S. aureus* apresentou sensibilidade frente ao extrato hidroetanólico bruto ($512 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e as frações butanólica ($512 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e clorofórmica ($256 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). Estes resultados, comparativamente aos obtidos nesta pesquisa, possibilitam considerar que *C. regium* apresenta bom potencial antimicrobiano em relação a outras plantas medicinais utilizadas popularmente.

3.2 Ensaio antioxidante com o radical livre DPPH

O DPPH é um radical livre, estável em temperatura ambiente, que produz uma solução violeta em etanol. Na presença de componentes antioxidantes, o DPPH é reduzido, produzindo uma solução etanólica transparente.

A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de extrato utilizado, forneceu um IC₅₀ de 18,67 µg mL⁻¹, que é a concentração de extrato etanólico necessária para causar 50% de atividade antioxidante. Essa concentração foi significativa se comparada com antioxidantes comerciais como o ácido ascórbico (IC₅₀=2,15 µg mL⁻¹) e o Butil-hidroxi-tolueno (BHT) (IC₅₀=5,37 µg mL⁻¹) (SILVESTRI, 2010).

Sousa et al. (2007) avaliou a atividade antioxidante do extrato etanólico de cinco plantas medicinais. O IC₅₀ variou de 27,59 a 111,14 µg mL⁻¹, sendo que o extrato etanólico de cascas de *Terminalia brasiliensis* (IC₅₀=27,59 µg mL⁻¹) mostrou-se comparável aos controles positivos rutina (IC₅₀=27,80 µg mL⁻¹) e ácido gálico (IC₅₀=24,27 µg mL⁻¹), demonstrando assim, que esta planta tem boa atividade sequestradora do radical DPPH.

Evidências científicas permitem afirmar que a propriedade antioxidante de vegetais se deve, principalmente, a seus compostos fenólicos (ATOUI et al., 2005; KAHKONEN et al., 1999). Kaur & Kapoor (2002) encontraram uma correlação significativa e positiva ($r^2=0,66$, $p < 0,05$) entre a atividade antioxidante e conteúdo de fenóis totais em vegetais da dieta asiática. Os flavonóides apresentam, no organismo humano, uma série de atividades farmacológicas, dentre elas a mais importante é sua propriedade antioxidante no tratamento de diversas patologias tais como doenças cardíacas, arteriosclerose, cancro, doenças neurodegenerativas, envelhecimento, e outras relacionadas ao estress oxidativo. Este resultado permite prognosticar que a atividade antioxidante de *C. regium* se deve a presença de fenóis e flavonóides, determinada na triagem fitoquímica realizada neste trabalho.

A literatura mostra que as atividades antioxidante e antifúngica podem estar relacionadas ao tipo de compostos fenólicos presentes em uma ampla variedade de vegetais (EJECHI et al., 2009; VELIOGLU, 1998; VINSON, 1998), fato que motivou a possibilidade de se associar a atividade antifúngica em *Candida krusei*, avaliada neste trabalho, com a presença de fenóis.

As pesquisas buscam substâncias com atividade antioxidante, provenientes de fontes naturais, que possam atuar sozinhas ou sinergicamente com outros aditivos, que

funcionem como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e limitem o uso dos antioxidantes sintéticos e agentes conservadores (MELO & GUERRA, 2002).

3.3 Triagem fitoquímica inicial e determinação de fenóis totais, flavonóides e taninos

A Tabela 2 apresenta os resultados da triagem fitoquímica para a espécie *Cochlospermum regium*. Os testes indicaram a presença de flavonoides, fenóis e taninos, e em menor quantidade esteroides e triterpenos. Os resultados corroboram com Ritto et al (1996), que encontraram flavonóides, triterpenóides, taninos, saponinas, compostos fenólicos nas raízes de *Cochlospermum regium*. Com a quantificação dos principais compostos encontrados na triagem fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *C. regium* foi possível observar que há maior concentração fenóis (282,06 mg g⁻¹) e flavonoides (196,76 mg g⁻¹) e em menor quantidade os taninos (2,34 mg g⁻¹).

Tabela 2: Resultados da triagem fitoquímica para o extrato etanólico da folha de *Cochlospermum regium*

Compostos químicos	<i>Cochlospermum regium</i> (folhas)
Alcaloide (reagente Dragendorf)	-
Alcaloide (reagente de Mayer)	-
Alcaloide (reagente de Bouchardat)	-
Ácidos orgânicos (reagente de pasková)	+
Fenóis e Taninos	+++
Flavonoides	+++
Esteroides e triterpenos	++

+++ presença grande, ++ presença notável, + presença leve, -ausência.

Teste fitoquímico realizado por Audu Musa (2012) com frações do extrato de *Cochlospermum tinctorium* mostrou que a fração de butanol continha glicosídeos cardíacos, saponinas e carboidratos, enquanto que a fração de acetona contém antraquinonas, flavonóides e taninos.

Oliveira et al. (1996), não detectaram atividade antibacteriana para o compostos dihidrokaempferol 3-Oglucopiranosídeo (flavonóide) obtido dos rizomas de *C. regium* frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. No entanto,

com o extrato hexânico e a fração acetato de etila obtidos da raiz desta espécie mostraram atividade para ambas as bactérias e sua fração butanólica apresentou ação antibacteriana apenas para *E. coli*. Os referidos extratos e frações (OLIVEIRA et al. 1996) revelaram presença de taninos, o que pôde justificar a atividade antimicrobiana. A infusão preparada na concentração descrita pela medicina popular não demonstrou resultado efetivo.

Segundo Vale & Orlanda (2011), a atividade antimicrobiana de um extrato pode ser devido a presença de flavonoides e taninos, os quais estão presentes nas folhas de *C. regium*, sugerindo possível atividade antimicrobiana. Os flavonoides são substâncias hidroxiladas, fenólicas conhecidas por serem sintetizadas pelas plantas em resposta a infecções microbianas, justificando seu efeito antimicrobiano *in vitro* contra diversas bactérias. Esta atividade é provavelmente devido a sua habilidade de formar complexos com proteínas solúveis extracelulares e com a parede celular, ou ainda o caráter lipofílico dos flavonoides serem responsáveis pela ruptura da membrana celular dos micro-organismos (TSUCHIYA et al, 1996; COWAN, 1999).

Os compostos fenólicos possuem ação antifúngica e esta pode ocorrer, entre outros mecanismos, pela inativação de sistemas enzimáticos dos micro-organismos envolvidos na produção de energia e na síntese de componentes estruturais (PORTE & GODOY, 2001).

Para Monteiro et al. (2005), os taninos são compostos que possuem a habilidade de formar complexos com proteínas que são insolúveis em água. Segundo Simões et al. (2002), acredita-se que esta atividade é devido à inibição de enzimas de bactérias e fungos, à ação direta na membrana dos micro-organismos ou pela competição pelos íons metálicos, essenciais ao metabolismo microbiano.

O estudo dos constituintes químicos presentes nessas plantas indica, na maioria das vezes, um motivo para novos estudos, pois permite o conhecimento prévio dos extratos e aponta a provável natureza das substâncias presentes, tornando mais fácil a escolha de futura técnica de identificação e fracionamento cromatográfico (MACIEL et al., 2002).

3.4 Análise do extrato via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detector de arranjo de diodos (DAD)

Os cromatogramas e espectros de UV-vis (Espectroscopia UV/visível) não foram apresentados para todos os padrões, tendo em vista que não foi possível

relacionar nenhum padrão com uma substância. O grupo 2 de espectros de UV indica que temos 6 substâncias que pertencem a mesma classe de compostos, neste caso foi possível compararmos o espectro de UV com o da rutina indicando que estas substâncias pertencem a classe dos flavonoides (flavonol), estes dados estão de acordo com a literatura encontrada para o estudo químicos das raízes de *Cochlospermum regium* (SOLON, 2012). Dos espectros de UV 1, 3, 4 e 5 não foi possível determinarmos a classe dos compostos (Figura 2).

Cueto et al (2011) relata que a análise cromatográfica do extrato etanólico de própolis indicou a presença de flavonoides como rutina, quercetina e ácido gálico. O flavonóide rutina é uma substância amplamente difundida no reino vegetal e apresenta atividades biológicas importantes, tais como ação antioxidante, vasodilatadora, anti-inflamatória (DE SOUZA, 2004).

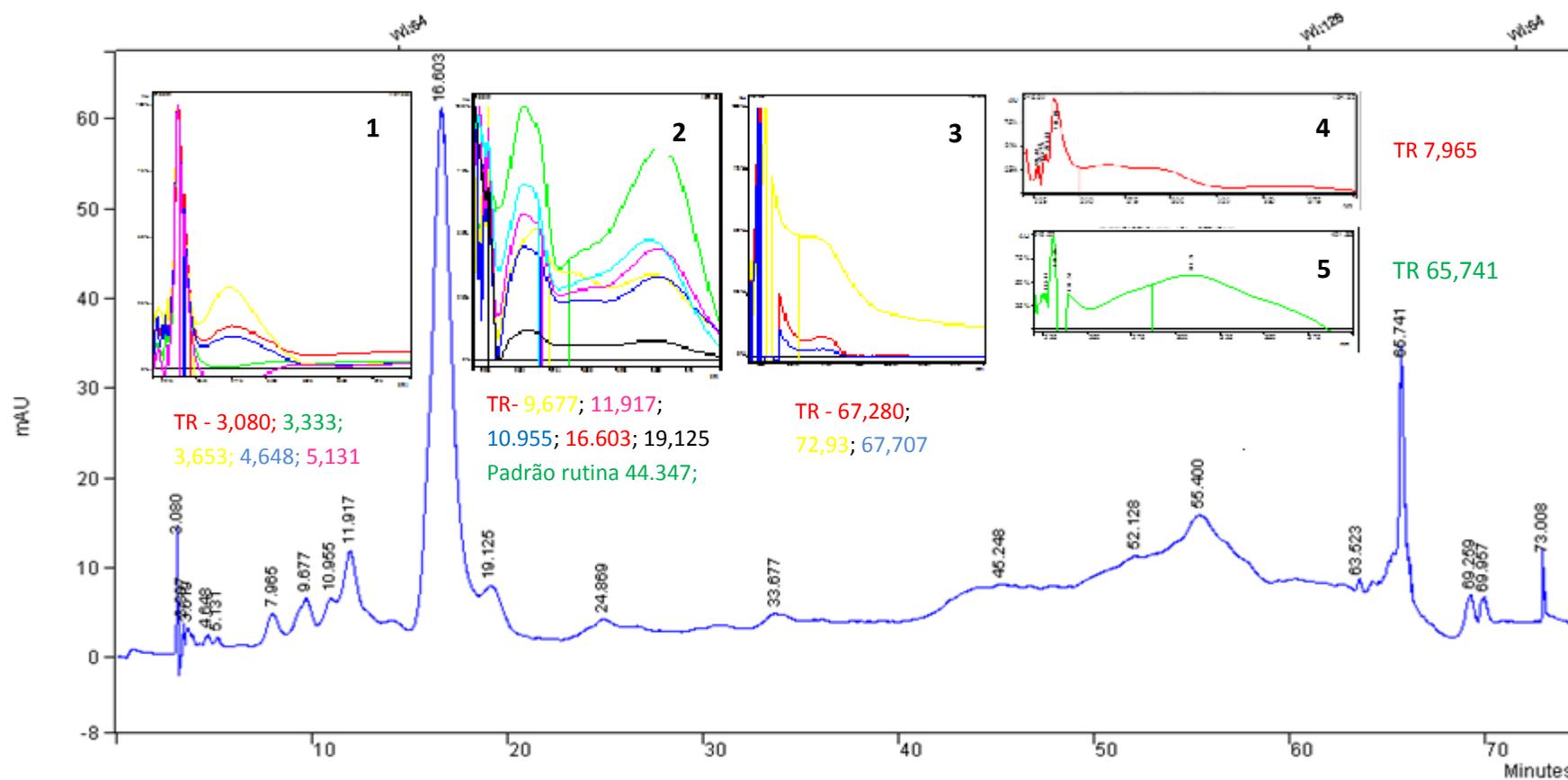


Figura 2: Perfil cromatográfico e espectros de UV obtido via CLAE analítica do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium*.

3.5 Teste de *Allium cepa*

O sistema de teste de *Allium cepa* é aceito para o estudo de efeitos de citotoxicidade e toxicidade de plantas medicinais, porque as suas raízes ficam em contato direto com a substância testada, permitindo a avaliação de concentrações diferentes. As alterações cromossômicas e as da divisão das células meristemáticas da raiz de cebola são frequentemente usadas para alertar a população sobre o consumo do produto (VICENTINI et al., 2001).

Os efeitos citotóxicos de *Cochlospermum regium* em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* foram avaliados em tratamento descontínuo em diferentes concentrações (0,2; 0,3 e 0,5 mg mL⁻¹) posteriores à germinação. Com os resultados desse tratamento, verificou-se que os índices mitótico (IM) e de alteração (IA) não apresentaram diferenças significativas, comparadas ao grupo do controle positivo, sugerindo que o extrato de *C. regium* não interfere na divisão celular (Figura 3).

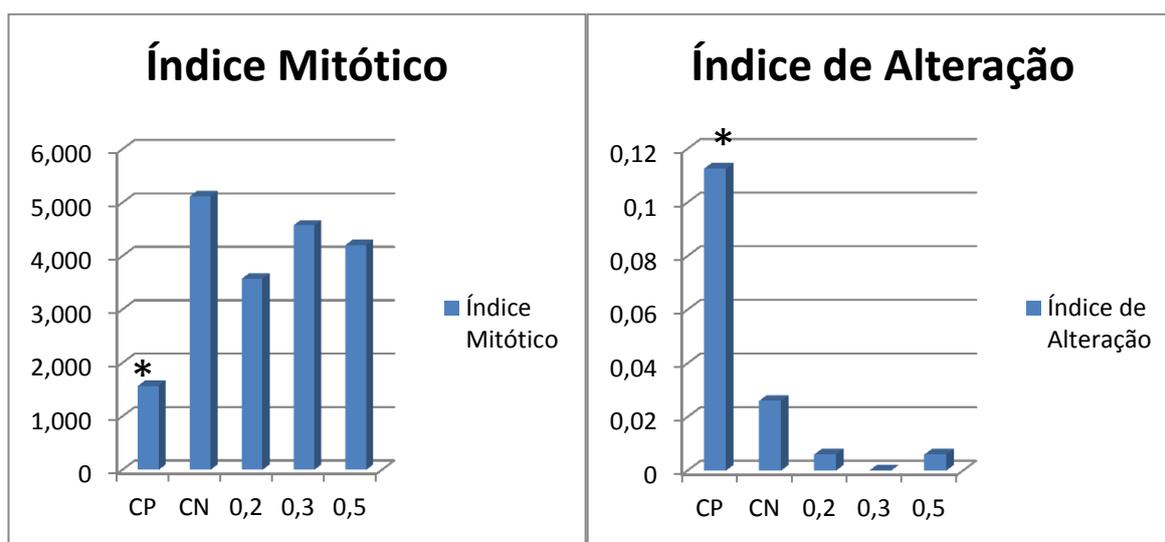


Figura 3: Média do Índice mitótico e Índice de alteração das sementes de *Allium cepa* em resposta ao tratamento descontínuo com extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* submetidas aos tratamentos 0,2; 0,3; 0,5 mg mL⁻¹, CN e CP. *Valores estatisticamente significativos do controle positivo em relação às concentrações pelo teste de Mann-Whitney $p \leq 0,05$. CN: Controle negativo; CP: Controle Positivo.

No tratamento descontínuo o extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* não alterou o índice de divisão e não apresentou aumento de alterações cromossômicas em relação ao controle negativo e positivo, o que indica ausência de genotoxicidade e mutagenicidade. Os resultados encontrados por Askin-Çelik &

Aslanturk (2006) indicam que o extrato aquoso de folhas de *Plantago lanceolata* também não possui efeito genotóxico.

Nunes & Carvalho (2003), verificaram que extrato de raiz de *C. regium* nas concentrações 13, 19 e 25g L⁻¹ não mostrou atividade mutagênica direta nem indiretamente sobre larvas de *Drosophila melanogaster* pelo teste RXL (ring-X loss). Entretanto, Castro et al. (2004) mostraram que o extrato da raiz de *C. regium* apresentou atividade mutagênica e citotóxica em eritrócitos da medula óssea de camundongos. Segundo os autores, esses efeitos são dados pela presença dos flavonóides e taninos.

Andrade *et al.* (2008), avaliaram o extrato aquoso de *C. regium* nas concentrações de 114mg kg⁻¹, 76mg kg⁻¹, 38mg kg⁻¹ e 29mg kg⁻¹ simultaneamente a Ciclofosfamida e Mitomicina C em camundongos (Swiss) e realizou o teste do micronúcleo em eritrócitos do sangue periférico, observando que não houve redução na frequência de micronúcleo em eritrócitos policromáticos, portanto não exibindo efeito antimutagênico.

A ausência de compostos como os alcalóides, principalmente os pirrolizidínicos, pode ser explicação para ausência de efeitos tóxicos do extrato etanólico de *C. regium*, uma vez que esses metabólitos são responsáveis pela hepatotoxicidade de algumas espécies medicinais, como *Symphytum officinalis* (ELVIN-LEWIS, 2001).

As alterações encontradas nas diferentes concentrações utilizadas no tratamento descontínuo foram ponte e perda cromossômica e micronúcleo. No controle negativo foram encontradas alterações como quebra e ponte cromossômica, já no controle positivo foi possível observar maior número de alterações como célula binucleada e multipolar, ponte cromossômica, micronúcleo e C-metáfase.

Laughinghouse et al (2012) fez o biomonitoramento da genotoxicidade e citotoxicidade do extrato metanólico de *Microcystis aeruginosa* pelo teste de *Allium cepa*, e observou os seguintes efeitos nas células: quebra cromossômica durante a metáfase, formação de ponte na anáfase, quebras cromossômicas durante a anáfase, micronúcleos e alterações morfológicas.

Os valores do comprimento das raízes das sementes de *Allium cepa* obtidos no tratamento contínuo mostraram inibição no desenvolvimento das raízes expostas em todas as concentrações no extrato etanólico das folhas de *C. regium*. Um agente pode ser considerado tóxico quando promove redução superior a 50% no índice de germinação (IG) de sementes de *Allium cepa*, em relação ao controle negativo (FISKESJÖ, 1985). Os índices de germinação das sementes de *Allium cepa* sob

tratamento contínuo no extrato etanólico das folhas de *C. regium* foram de 59,09% na concentração de 0,2 mg mL⁻¹, 51,04% em 0,3 mg mL⁻¹, 41,86% em 0,5 mg mL⁻¹. Esses resultados indicam que houve redução no índice de germinação em todas as concentrações testadas quando comparadas com o controle negativo, que teve um IG de 56,97% e no controle positivo foi de 60,63%, podendo-se observar que o índice foi afetado proporcionalmente ao aumento da concentração do extrato (Figura 4). Esses dados demonstram que as concentrações testadas não estão próximas do limite para toxicidade de *C. regium* em células vegetais.

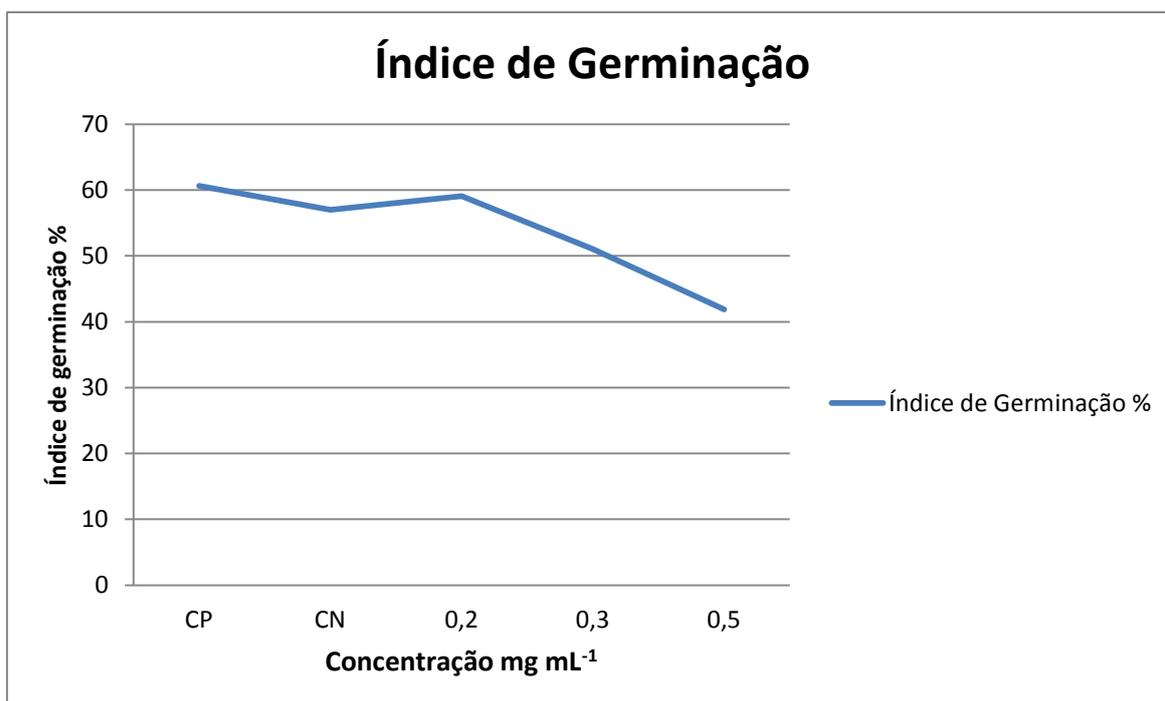


Figura 4: Índice de germinação das sementes de *A. cepa* em resposta ao tratamento contínuo com o extrato etanólico de folhas de *Cochlospermum regium*, nas concentrações de 0,2; 0,3 e 0,5 mg mL⁻¹, controle negativo (CN) e positivo (CP).

Akinboro & Bakare (2007) testou o nível de toxicidade do extrato aquoso de cinco plantas medicinais através do teste de *Allium cepa*. Observou-se crescimento radicular limitado nos extratos aquosos de *Azadirachta indica* e *Morinda lúcida*, nas concentrações de 2,6 e 0,8%.

Embora o controle positivo (ciclofosfamida) tenha influenciado sobre o índice mitótico, não interferiu no índice de germinação das raízes das sementes de *Allium cepa*. O teste de germinação com vegetais é um modelo amplamente utilizado para avaliar o potencial aleloquímico de extrato da planta ou de substâncias isoladas, e um dos efeitos previstos quando determinado composto interfere no funcionamento celular

é a alteração no índice de germinação das sementes, revelando ação tóxica e/ou citotóxica (LUZ et al., 2012).

4. CONCLUSÃO

A atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *E. faecalis* e *C. krusei*, pode ser associada aos compostos químicos encontrados no extrato etanólico das folhas de *C. regium*, demonstrando possibilidade de opção de tratamento para leveduras e bactérias altamente resistentes.

Considerando que substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos e boa atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *C. regium* descritos neste trabalho, estimulam a continuidade dos estudos para avaliar a ação antioxidante de substâncias isoladas de *C. regium*.

Os resultados deste estudo indicam ausência de efeitos tóxicos do extrato etanólico das folhas de *C. regium*, pois este não interfere na divisão celular. O teste de *Allium cepa* é um excelente bioindicador de alterações cromossômicas que servem como alerta para a população que utiliza chás medicinais indiscriminadamente. Embora o bioteste seja primeira avaliação de toxicidade, ele mostra a importância descobertas científicas e novas adaptações do teste podem revelar inúmeras possibilidades do seu uso, evitando o uso de animais para os testes.

Apesar do crescente uso de plantas medicinais com fins terapêuticos é importante a comprovação do seu efeito farmacológico. As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular, caracterização estudo do mecanismo de ação dos princípios ativos, avaliação farmacológica dos extratos e identificação dos compostos químicos. No Brasil, onde a população tem baixo acesso a medicamentos, pesquisas científicas na área de plantas medicinais, indicam as mesmas com baixo custo e fácil acesso, diminuição de efeitos adversos, evitando ou diminuindo os riscos de intoxicações por uso inadequado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINBORO, A.; BAKARE, A.A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p.470–475, 2007.

ANDRADE, L.S. et al. Absence of antimutagenicity of *Cochlospermum regium* (Mart. and Schr.) Pilger 1924 by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 155-159, 2008.

ARAÚJO, M.G.F. et al. Chemical constituents of the methanolic extract of leaves of *Leiothrix spiralis* Ruhland and their antimicrobial activity. **Molecules**, v.16, p.10479-10490, 2011.

ASKIN-ÇELİK, T.; ASLANTURK, O.S. Anti-mitotic and antigenotoxic effects of *Plantago lanceolata* aqueous extract on *Allium cepa* root tip meristem cells. **Cellular and Molecular Biology**, v.61, n.6, p.693-7, 2006.

ATOUI, A.K. et al. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, p. 27-36, 2005.

AUDU MUSA, A. Cytotoxicity Activity and Phytochemical Screening of *Cochlospermum tinctorium* Perr Ex A. Rich Rhizome. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.2, n.7, 2012.

BAGIU, R.V.; VLAICU, B.; BUTNARIU, M. Chemical composition and in vitro antifungal activity screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae). **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p.1426-1436, 2012.

BENLI, M; YİĞİT, N.; KAYA, I. Antimicrobial Activity of Various Extracts of *Satureja hortensis* L. **Journal of Applied Biological Sciences**, v.1, n.1, p.25-31, 2007.

CASTRO, D. B.; SANTOS, D. B.; FERREIRA, H. D.; SANTOS, S. C.; CHEN-CHEN, L. Atividades mutagênica e citotóxica do extrato de *Cochlospermum regium* Mart. (algodãozinho-do-campo) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.6, n.3, p.15-19, 2004.

CETINUS, S.A.; GOZE, I.; SARAÇ, B.; VURAL, N. Sacavenging effect and antispasmodic activity of the essential oil of *Ciclotrichium niveum*. **Fitoterapia**, v.78, n.2, p.129-133, 2007.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A3. 3rd ed.; Wayne: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008.

CORREA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, p. 747. Imprensa Nacional (Ministério da Agricultura, Ind. e Comércio), Rio de Janeiro, v.6, p.777, 1975.

COSTA, A. F. *Farmacognosia*. 3 ed. Lisboa. Fundação Calouste Guibenkian, 1982, v.3, p.1032.

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

CUETO, A. P. et al. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. **Ciência Rural**, v.4, n.10, p.1800-1806, 2011.

DE SOUZA, R.F., DE GIOVANI, W.F. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. **Redox Report**, v.9, n.2, p.97-104, 2004.

EJECHI, B.O.; NWAFOR, O.E.; OKOKO, F.J. Growth inhibition of tomato-rot fungi by phenolic acids and essential oil extracts of pepperfruit (*Dennetia tripetala*). **Food Research International**, v.32, n.6, p.395-399, 1999.

ELSNER H.A., SOBOTTKA I., MACK D., et al. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.19, p.39-42, 2000.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, n.2, p.141-164, 2001.

FERREIRA, A.J.P.; KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. & MACARI, M. *Doenças das Aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.197-205.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test: a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v.102, p.99-112, 1985.

FOXMAN B, BROWN P. Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence and cost. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.17, p.227-241, 2003.

GRAY J.W., PEDLER S.J. Antibiotic-resistant enterococci. **Journal of Hospital Infection**, v.21, p.1-14,1992.

HARBARTH S., COSGROVE S., CARMELI Y. Effects of antibiotics on nosocomial epidemiology of vancomycin-resistant enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.1619-1628, 2002.

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**, v.97, p.1027-1031, 2002.

IWEN, P.C.; KELLY, D.M.; REED, E.C.; HINRICHS, S.H. Invasive infection due to *Candida krusei* in immunocompromised patients not treated with fluconazole. **Clinical Infectious Diseases**, v.20, p.342-347, 1995.

KAHKONEN, M.P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n.10, p. 3954-3962, 1999.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.123-140, 2004.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science & Technology**, v.37, p.153-161, 2002.

LAUGHINGHOUSE IV, H.D.; PRÁ, D.; SILVA-STENICO, M.E.; RIEGER, A.; FRESCURA, V.D.S.; FIORE, M.F.; TEDESCO, S.B. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, v.432, p.180-188, 2012.

LEWIS, D.A; HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. In: Ellis GP (Eds.) **Progress Medicinal Chemistry**. New York: Elsevier Science Publishers vol. 28, p. 201-231, 1991.

LIMA et al. Metabólitos secundários de *Cochlospermum regium*. **Fitoterapia**, v.66, p.545-46, 1995.

LUZ, A.C.; PRETTI, I.R.; DUTRA, J.C.V.; BATITUCCI, M.C.P Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste *in vivo*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.4, p.635-642, 2012.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J. R. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n.1, p. 1-11, 2002.

MERCK, E. Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel. Darmstadt: Merck, 1980. p.76.

MOKBEL, M. S.; HASHINAGA, F. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. **Food Chemistry**, v.94, p.529-534, 2006.

MONTEIRO, J. M. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v.28, n.5, p.892-896, 2005.

MORRISON A.J. Jr., WENZEL R.P. Nosocomial urinary tract infections due to Enterococcus. Ten years' experience at a university hospital. **Archives of Internal Medicine**, v.146, p.1549-1551, 1986.

MOURE, A.; CRUZ, J.M. FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NUÑES, M.J.; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources (Review). **Food Chemistry**, v.72, n.2, p.145-171, 2001.

NUNES, W. B.; CARVALHO, S. de. Evaluation of the potencial of *Cochlospermum regium* in *Drosophila melanogaster* male germ cells. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.26, n.4, p.545-549, 2003.

OLIVEIRA, C.C. de; SIQUEIRA, J.M. de; SOUZA, K.C.B.; RESENDE, U.M. Antibacterial activity of rhizomes from *Cochlospermum regium* preliminary results. **Fitoterapia**, v.67, n.2, p.176-177, 1996.

PANGHAL, M.; KAUSHAL, V.; YADAV, J. In vitro antimicrobial activity of ten medical plants against clinical isolates of oral cancer cases. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.10, p.21-3, 2011.

PEREIRA, C. B., MARIN, A., DALMORA, S. L., NECCHI, R. M. M., ROSSATO, L., ALVES, S. H., & MANFRON, M. P. Atividade Antimicrobiana e Citotoxicidade do

extrato bruto obtido de *Morus Alba* L.(Moraceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, n.1, 2012.

PETROLINI, F. V. B; LUCARINI, R.; SOUZA, M. G. M.; PIRES, R. H.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Evaluation of the antibacterial potential of *Petroselinum crispum* and *Rosmarinus officinalis* against bacteria that cause urinary tract infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2012.

PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, Indústria e Comércio, p.747, 1975.

PORTE, A.; GODOY, R.L.O. Alecrim (*Rosmarinus offi cinallis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (B. CEPPA)**, Curitiba, v. 19, n.2, p.193-210, 2001.

RITTO, J.L.A.; OLIVEIRA, F.; CARVALHO, J.E.; DIAS, P.D. Avaliação farmacológica do extrato fluido de *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr.) Pilger. **LECTA-USF**, Bragança Paulista, v.14, n.2, p.27-36, 1996.

SANTOS, P.A. et al. Triterpenoids and flavonoids from *Lychnophoriopsis candelabrum* – Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.509-512, 2004.

SCOTTI, L. et al. Experimental methodologies and evaluations of computer-aided drug design methodologies applied to a series of 2-aminothiophene derivatives with antifungal activities. **Molecules**, v.17, p.2298-2315, 2012.

SILVA, O., DUARTE, A., CABRITA, J., PIMENTEL, M., DINIZ, A., & GOMES, E. Antimicrobial activity of Guinea-Bissau traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.50, n.1, p.55-59, 1996.

SILVESTRI, J.D.F., et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v.57, n.5, p.589-594, 2010.

SIMÕES, C.M. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: UFSC, 2002. P. 798.

SIQUEIRA, J.M., CASTRO, M.S.A., MELLO, J.C.P., KASSAB, N.M., VIEIRA, I.C.P., AMORIM, L.W.K., GUERRA, M.C., RESENDE, U.M. Flavanona do extrato hidroalcoólico de *Cochlospermum regium* (MART. and SCH.) Pilger (algodãozinho-do-campo). **Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, Fortaleza, 1994.

SOLON, S. et al. Phenolic derivatives and other chemical compounds from *Cochlospermum regium*. **Química Nova**, v.35, p.1169-1172, 2012.

SOUSA, C.D.M., et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SUFFREDINI, I.B., VARELLA, A.D., YOUNES, R.N. Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de três extratos vegetais antibacterianos selecionados da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica brasileiras/ Minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration results from three selected antibacterial plant extracts from the Amazon. **Journal of the Health Sciences Institute**, v.25. n.2, 2007.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUYIWARA, S.; OHYAMA, M.; TAKASA, T.; LINUMA, M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.50, p. 27-34, 1996.

VALE, V.V.; ORLANDA, J.F.F. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). **Scientia Plena**, v.7. n.4, 2011.

VELIOGLU, Y.S. Antioxidant activity and total phenolic in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.4113-4117, 1998.

VELOSA, A.S.V., TORRES, D., PEREIRA, R.M.S. Síntese e caracterização de complexos de metais de transição, potencialmente bioativos, contendo os flavonóides rutina e hesperedina como ligantes. I Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica UNIBAN.

VICENTINI V.E.P, CAMPAROTO M.L., TEIXEIRA RO, MANTOVANI M.S. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal

herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, v.23, p.593-598. 2001.

VINSON, J.A. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3630-3634, 1998.

VIOLANTE, I.M.P.; HAMERSKI, L.; GARCEZ, W.S.; BATISTA, A.L.; CHANG, M.R.; POTT, V.J.; GARCEZ, F.R. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1302-1308, 2012.

WALL, M.E., KRIDER, M.M., KREWSON, C.F., EDDY, C.R., WILLAMAN, J.J., CORELL, D.S.; GENTRY, H.S. Steroidal sapogenins VII. Survey of plants for steroidal sapogenins and other constituents. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v.43, n.1, p.1-7, 1954.

WINGARD, J.R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clinical Infectious Diseases**, v.20, p.115-125, 1995.

YAN, Z.; HUA, H.; XU, Y.; SAMARANAYAKE, L.P. Potent antifungal activity of pure compounds from traditional chinese medicine extracts against six oral *Candida* species and the synergy with fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.10, p.1-6, 2012.