



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM ENFERMAGEM**

Cristiane do Nascimento Tavares Figueira

Avaliação da atividade antimicrobiana, citotóxica e capacidade sequestradora de radicais livres de extratos brutos do *Cocos nucifera* Linn.

Cristiane do Nascimento Tavares Figueira

Avaliação da atividade antimicrobiana, citotóxica e capacidade sequestradora de radicais livres de extratos brutos do *Cocos nucifera* Linn.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas como cumprimento às exigências para a obtenção do título de **Mestre em Enfermagem**: Área de concentração - Enfermagem no cuidado em saúde e na promoção da vida.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lysete de Assis Bastos

Coorientadora: Profa. Dra. Eliane Aparecida Campesatto

Maceió – AL
2012

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecária
Bibliotecário: Fabiana Camargo dos Santos

- F475a Figueira, Cristiane do Nascimento Tavares.
Avaliação de atividade antimicrobiana, citotológica e capacidade sequestradora de radicais livres de extratos brutos do *Cocos nucifera* Linn. / Cristiane do Nascimento Tavares Figueira. – 2012.
120 f. : il., graf., tab.
- Orientadora: Maria Lysete de Assis Bastos.
Co-orientadora: Eliane Aparecida Campesatto.
Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2012.
- Bibliografia: f. 73-91.
Apêndices: f. 92-107.
Anexos: f. 108-120.
1. *Cocos nucifera* Linn. 2. Plantas medicinais – Pesquisa experimental. 3. Enfermagem – Pesquisa. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Citotoxicidade. 6. Antioxidante. I. Título.

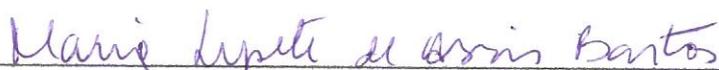
CDU: 616-083:615.322

Cristiane do Nascimento Tavares Figueira

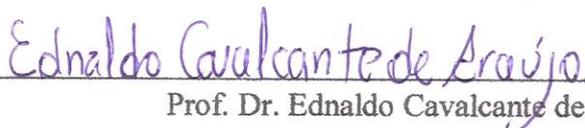
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E CAPACIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES DE EXTRATOS BRUTOS DO *COCOS NUCIFERA* LINN.

Dissertação apresentada à Banca examinadora da defesa, vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem – Mestrado, da Escola de Enfermagem e Farmácia, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de **Mestre em Enfermagem**.

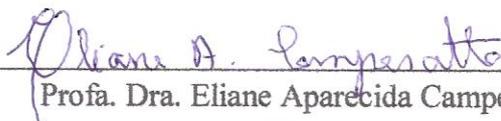
BANCA EXAMINADORA



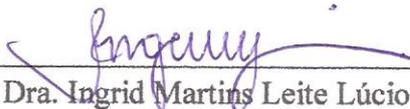
Profª. Dra. Maria Lysete de Assis Bastos
Presidente - Orientadora
Universidade Federal de Alagoas (UFAL)



Prof. Dr. Ednaldo Cavalcante de Araújo
Efetivo
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)



Profª. Dra. Eliane Aparecida Campesatto
Efetivo
Universidade Federal de Alagoas (UFAL)



Profª. Dra. Ingrid Martins Leite Lúcio
Suplente
Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

Aprovada em: 21 / 12 / 2012

Ao que brotou: Ruanir, mas permaneceu na presença de DEUS.

Com amor de mãe.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me fortalece e me conduz a cada dia.

Aos meus pais Tavares e Cicera, por serem meus espelhos de dignidade e pilares do meu progresso. *As minhas irmãs Cristina e Katiane e meu primeiro sobrinho Lucas* tão pequeno, mas chegou com imensa bagagem de felicidades; a todos da *minha família querida que muito me apoiam inclusive nesta jornada. Meu refúgio e amor.*

Ao meu marido Rui Figueira, por compreender minhas ausências e me apoiar inclusive na área de informática.

A minha orientadora *Profa. Dra. Maria Lysete de Assis Bastos* que compartilhou comigo seu vasto conhecimento, sua experiência e semeou seu espírito inovador e visionário de fazer Enfermagem.

A Profa. Dra. Eliane Aparecida Campesatto pela coorientação, incentivo e amizade.

As Profas. Dras. do Programa de Pós-graduação em Enfermagem, por compartilharem seus conhecimentos e possibilitarem a concretização desta primeira turma de Mestrado em Enfermagem/Ufal.

Ao Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento pelas críticas e sugestões a este estudo, que culminaram no aprimoramento, além do apoio nas rotaevaporações.

A Profa. Dra. Lucia Maria Conserva por permitir o acesso ao laboratório de Fitoquímica e ao *Prof. Doutorando Jésus Costa Ferreira Júnior* por nortear os ensaios antioxidantes e orientações nos cálculos químicos; ao enfermeiro mestrando *Jayran Almeida* e a todos do Instituto de química e biotecnologia pela colaboração.

A Profa. Dra Magna Suzana por oportunizar os ensaios de citotoxicidade e às *farmacêuticas Doutorandas Aline Cavalcante e Yolanda Karla* pelo apoio na realização e esclarecimentos.

Ao Prof. Dr. Antonio Euzébio Goulart de Sant'Ana e ao *Prof. Doutorando Pedro Vieira* do Instituto de Química e Biotecnologia pela liofilização.

Ao Prof. Dr. João Xavier pelo uso do laboratório de farmácia e orientações. A doutoranda *Lorena Pessini* pela colaboração e *ao Prof. Doutorando Valter Alvino* por direcionar os ensaios de perfuração em Ágar e *insites* em microbiologia.

As Profas. enfermeiras e doutorandas: Patrícia Sarmiento, Regina Sales e Thaís Honório que compartilharam suas experiências comigo.

A *mestranda Jirliane Martins*, companheira nas pesquisas, com quem caminhei e compartilhei as minúcias de todo processo e a *todos do Laboratório de pesquisa e tratamento de feridas/Ufal - LpTF* pela colaboração nos ensaios antimicrobianos.

As *instituições em que trabalho, Hospital Universitário Professor Alberto Antunes - HUPAA e Hospital Geral do Estado de Alagoas - HGE* que permitiram meu afastamento parcial, em especial ao Diretor do HUPAA Dr. *Paulo Teixeira*, as coordenadoras do HGE *Sandra Márcia e Carmem Lúcia*, e as colegas enfermeiras *Clarigleide Menezes e Eleonora Moraes*, que possibilitaram minha substituição; o que tornou possível a concretização deste Mestrado.

A *Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Alagoas – FAPEAL* e a *Profa. Dra. Sandra Nunes Leite* que possibilitou ajuda parcial de custo.

Aos membros da banca examinadora pelas valiosas contribuições *Prof. Dr. Ednaldo Cavalcante* (UFPE) e *Profa. Dra. Ingrid Lúcio* (Ufal).

A *botânica Rosângela Pereira de Lyra Lemos* do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas (IMA) pelo reconhecimento e catalogação da espécie vegetal.

A todas as pessoas, profissionais e estudantes dos laboratórios da Ufal e aos amigos que encontrei ao longo deste percurso, que muito contribuíram e sem as quais não seria possível chegar até aqui. A todos minha sincera gratidão.

RESUMO

Cocos nucifera Linn. é uma palmeira tropical cujo fruto é utilizado para fins alimentícios, cosméticos, artesanais e medicinais. No entanto, a investigação das demais partes desta espécie é incipiente. Pesquisas sobre atividades terapêuticas de plantas usadas pela população são incentivadas pela Organização Mundial de Saúde e no Brasil, fomentada por 10 mil espécies vegetais catalogadas e apenas 10% avaliadas com relação a suas atividades biológicas e segurança. A Resolução do Conselho Federal de Enfermagem nº 197/1997 respalda o uso de plantas na prática da assistência em Enfermagem e atrelado à necessidade de alternativas diante da multirresistência microbiana e doenças oxidativas que são agravos contemporâneos da humanidade, realizou-se esta pesquisa experimental pré-clínica no programa de Mestrado em Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas, com objetivo de investigar a atividade antimicrobiana, citotóxica e capacidade sequestradora de radicais livres dos extratos brutos etanólicos das folhas, pecíolo e casca do caule do *Cocos nucifera* L. (coqueiro anão verde) *in vitro*. Foram avaliadas as atividades antimicrobianas dos extratos frente às bactérias Gram positiva: *S. aureus* e Gram negativas: *E. coli* e *P. aeruginosa* e ao fungo *Candida albicans* pelos métodos de difusão em Ágar e identificação das Concentrações Inibitórias Mínimas pela microdiluição. Realizou-se teste de citotoxicidade em células da linhagem J774 pelo MTT [Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolio] e verificação do potencial antioxidante pelos métodos qualitativo e quantitativo da capacidade sequestradora de radicais livres. Os resultados confirmaram o potencial antioxidante frente ao radical sintético DPPH com CI_{50} de $135,03 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ e $179,22 \pm 2,1 \mu\text{g/mL}$ dos extratos do caule e folha respectivamente, enquanto os extratos do pecíolo e folha etanólica/metanólica (EtOH/MeOH) apenas apresentaram capacidade sequestradora de radicais livres no ensaio qualitativo. Os extratos do pecíolo e folha do *Cocos nucifera* L. inibiram o crescimento bacteriano de *S. aureus* e *P. aeruginosa* com menor concentração inibitória do crescimento 10mg (5%). Não houve inibição do crescimento de *E. coli* e *C. albicans* na concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC pelos extratos a 10%. Os extratos brutos do *C. nucifera* Linn. não apresentaram citotoxicidade nas concentrações de 200 e 100 $\mu\text{g/mL}$; o extrato bruto etanólico do pecíolo não causou citotoxicidade na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. O solvente DMSO 2% foi citotóxico, o que inviabilizou a análise dos extratos a 2000 μg . Os resultados comprovam a existência de atividade sequestradora de radicais livres, antimicrobiana e a ausência de citotoxicidade em alguns dos extratos brutos das folhas (lâmina), pecíolo e casca do caule do *Cocos nucifera* Linn coletado em solo Alagoano.

Palavras chaves: Enfermagem. Pesquisa experimental. *Cocos nucifera* Linn. Antioxidantes. Antimicrobiano. Citotoxicidade. Plantas medicinais.

ABSTRACT

Cocos nucifera Linn is a tropical palm tree whose fruit is used for alimentary, cosmetics, handmade and medicinal purposes. However the research from other parts of this species is incipient. The researchs about therapeutic activities from plants used by population is encouraged by the Health World Organisation and, in Brazil, fomented by 10 thousand vegetable species cataloged and only 10% evaluated with respect to their biological activities and safety. The resolution No. 197/1997 of the Federal Council of Nursing endorses the use of plants in the practice of nursing care and linked to the need for alternatives against microbial multiresistance and oxidative diseases which are problems contemporaries of humanity. This preclinical experimental research was performed at the Master's Program in Nursing at the Federal University of Alagoas in order to investigate the antimicrobial activity and cytotoxicity and free radical scavenging capacity of crude ethanol extracts of the leaves, stem and stalk's husk of *Cocos nucifera* L. (coconut palm) *in vitro*. It was evaluated the extract's antimicrobial activities against the Gram positive bacteria: *S. aureus* and Gram negative: *E. coli* and *P. aeruginosa* and *C. albicans* fungus by Àgar diffusion methods and identification of the Minimum Inhibitory Concentrations by microdilution. It was performed cytotoxicity assay in J774 lineage cells by MTT [3 - (4,5-dimethylthiazol-2) -2,5-diphenyltetrazolium bromide] and verification of the antioxidant potential by qualitative and quantitative methods of free radical scavenging ability. The results confirmed the antioxidant potential against the DPPH with CI50 of 135.03 ± 0.04 mg / mL and 179.22 ± 2.1 mg / mL from extracts of stem and leaf respectively while stem and ethanolic and methanolic leaf only showed free radical scavenging capacity in qualitative assay. The extracts of stem and leaves of the *Cocos nucifera* L. inhibited bacterial growth of *S. aureus* and *P. aeruginosa* with lower growth inhibitory concentration of 10mg (5%). There was no growth inhibition of *E. coli* and *C. albicans* at a concentration of 1.5×10^6 UFC with extracts by 10%. The crude extracts of *Cocos nucifera* Linn didn't showed cytotoxicity at concentrations of 200 and 100 mg / mL; crude ethanol extract of the stem did not cause cytotoxicity at concentration of 1000 mg / mL. The DMSO 2% solvent was cytotoxic, making unfeasible analysis of the extracts at 2000µg. The results confirm existence of free radical scavenging and antimicrobial activity and absence of cytotoxicity in some of crude extracts of the leaves, stem and stalk's husk of the *Cocos nucifera* Linn collected in Alagoas soil.

Keywords: Nursing. Experimental research. Coconuts. Antioxidants. Antimicrobial. Toxicity. Medicinal plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Partes da espécie vegetal <i>C. nucifera</i> L. Fruto (A) e Planta (B).	25
Figura 2 - Local de coleta do <i>C. nucifera</i> L. (A) Alagoas. (B) Marechal Deodoro.....	34
Figura 3 - Preparo dos extratos: Extrator (A); Evaporador rotatório; (B) Estufa à vapor (C); Extratos do <i>C. nucifera</i> L. e Balança analítica (D).....	35
Figura 4 - Escala de MacFarland. Tubo 5 ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL).	37
Figura 5 - Esquema Ensaio Perfuração em Ágar.	38
Figura 6 - Esquema de redução do Cloreto 2,3,5 Trifenil Tetrazolium (TTC).	40
Figura 7 - Radical sintético: DPPH (A). Controle positivo: catequina (B).....	42
Figura 8 - <i>S. aureus</i> . Corado pelo método de Gram (A). Micrografia eletrônica (B).	49
Figura 9 - Inibição de <i>S. aureus</i> . Halo de 21 mm do extrato etanólico/metanólico (2:1) das folhas do <i>C. nucifera</i> L. (A). Controle Ceftriaxona - halo 26 mm (B).	51
Figura 10 - Inibição de <i>P. aeruginosa</i> . Halos 12 mm pelo extrato etanólico/metanólico (2:1) das folhas do <i>C. nucifera</i> L.(A). Controle Ciprofloxacino - halo 34 mm (B).....	51
Figura 11 - Eppendorfs. Inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> pelos extratos do pecíolo EtOH (A) e da folha EtOH/MeOH (B) do <i>C. nucifera</i> L. MIC em 10 mg (5%)	54
Figura 12 - Placas de 96 poços: MIC em 20mg frente a <i>P. aeruginosa</i> pelos extratos das folhas em EtOH/MeOH e pecíolo EtOH do <i>C. nucifera</i> L.	55
Figura 13 - Eppendorf: MIC do pecíolo EtOH frente a <i>P. aeruginosa</i>	55
Figura 14 - Eppendorf: MIC da folha MeOH/EtOH frente a <i>P. aeruginosa</i>	56
Figura 15 - Redução do sal de tetrazólio (MTT) em cristais de formazan	57
Figura 16 - Atuação dos extratos do <i>C. nucifera</i> L. (CNL) nas concentrações de 2000, 1000, 200 e 100 $\mu\text{g/mL}$ em macrófagos da linhagem J774.....	58
Figura 17 - Atoxicidade dos extratos do <i>C. nucifera</i> L. a 200 $\mu\text{g/mL}$ (colunas 7,8 e 9) e 100 $\mu\text{g/mL}$ (colunas 10, 11 e 12). Caule - CNL3 (E) atóxico a partir de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (colunas 4, 5, 6) e pecíolo a 1000 $\mu\text{g/mL}$ citotóxico - CNL4 (F).....	58
Figura 18 - Extrato folha EtOH do <i>C. nucifera</i> L. Revelação em iodo (A). Eluição em Hexano/Acetato(B). Placa de cromatografia.(C). Controle catequina (*).	60
Figura 19 - Cromatografia em camada delgada. Folha EtOH/MeOH (CNL). Eluição Hexano/Acetato (A). Controle catequina (*B).....	60
Figura 20 - Placa de cromatografia. Capacidade sequestradora de radicais livres. Caule (A) e Pecíolo (B). Controle: catequina (*).	61
Figura 21 - Espectrofotômetro e calibração da absorbância.....	62

Figura 22 - Cubetas com extrato do <i>C. nucifera</i> L. e DPPH.....	62
Figura 23 - Soluções metanólicas dos extratos.....	63
Figura 24 - Cinética do DPPH _{REM} aos extratos do <i>C. nucifera</i> L.....	68
Figura 25 - Cinética do DPPH _{REM} aos controles padrões: ácido gálico e BHT.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos antioxidantes, suas funções e exemplos.....	27
Tabela 2 - Rendimento das amostras desidratadas de <i>C. nucifera</i> L.	47
Tabela 3 - Rendimentos dos Extratos brutos de <i>Cocos nucifera</i> L.....	48
Tabela 4 - Halos de inibição do crescimento microbiano pelos extratos brutos do <i>C. nucifera</i> L. por difusão em disco (1000 µg/disco).	50
Tabela 5 - Halos de inibição do crescimento microbiano pelos extratos brutos do <i>C. nucifera</i> pela técnica de perfuração em Ágar.	52
Tabela 6 - Avaliação da menor concentração inibitória do crescimento microbiano (MIC) dos extratos brutos do <i>C. nucifera</i> Linn..	53
Tabela 7 - Sistema de eluição dos extratos do <i>C. nucifera</i> L. frente aos solventes: Hexano, Hexano/Acetato, Clorofórmio, Clorofórmio/Metanol..	59
Tabela 8 - Curva de calibração dos testes quantitativos frente ao DPPH.	63
Tabela 9 - Absorbâncias do extrato etanólico da folha do <i>C. nucifera</i>	64
Tabela 10 - Absorbâncias do extrato do caule do <i>C. nucifera</i> L.	64
Tabela 11 - Absorbâncias do extrato do pecíolo do <i>C. nucifera</i> L.	65
Tabela 12 - Absorbâncias do extrato da folha MetOH/EtOH do <i>C. nucifera</i> L.....	65
Tabela 13 - Tratamento estatístico da capacidade de sequestradora de radicais livres pelos extratos etanólicos das folhas do <i>C. nucifera</i> Linn..	66
Tabela 14 - Tratamento estatístico da incapacidade de sequestradora de radicais livres pelo extrato etanólico do pecíolo do <i>C. nucifera</i> L..	66
Tabela 15 - Tratamento estatístico da capacidade de sequestradora de radicais livres pelo extrato etanólico do caule do <i>C. nucifera</i> L..	67
Tabela 16 - Tratamento estatístico da incapacidade de sequestradora de radicais livres pelo extrato etanólico da folha MetOH/EtOH do <i>C. nucifera</i> L.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
AMH	Ágar Müller Hinton
ASD	Ágar Sabouroud Dextrose
ATCC	Coleção de células do tipo americana.
BHI	Brain-Heart Infusion
BHA	Butil Hidroxi Anisol
BHT	Antioxidante Butil Hidroxi Tolueno
°C	grau Celsius
CCCD	Coleção de células brasileiras produzidas pela CEFAR
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
C ₁₉ H ₁₅ N ₄ Cl	Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolio
C ₆ H ₁₄	Hexano
C95	Intervalo de Confiança 95%
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Clorofórmio
CI ₅₀	Concentração Inibitória capaz de inibir 50% da resposta
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL ₅₀	Concentração letal 50%
<i>C. nucifera</i> L.	<i>Cocos nucifera</i> Linn
CNL	<i>Cocos nucifera</i> Linn
CNL1	Extrato etanólico da folha do <i>Cocos nucifera</i> Linn
CNL2	Extrato etanólica/metanólico (2:1) da folha do <i>Cocos nucifera</i> Linn
CNL3	Extrato etanólico da pecíolo do <i>Cocos nucifera</i> Linn
CNL4	Extrato etanólico da casca do caule do <i>Cocos nucifera</i> Linn
CMH	Caldo Müller Hinton
DMSO	Dimetilsufóxido
DP	Desvio Padrão
DPPH	1,1-difenil-2-Picrilhidrazila
EtOH	Etanol
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
MeOH	Metanol
mM	miliMolar

mmHg	milímetro de mercúrio
mg	miligramas
mL	mililitro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OMS	Organização Mundial de Saúde
POP	Procedimento Operacional Padrão
q.s.p	Quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto
Rf	Fator de Retenção
SST	Solução Salina Tamponada
SF	Solução salina à 0,9%
SSF	Solução salina fosforilada
TTC	Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolio
Ufal	Universidade Federal de Alagoas
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta
µL	Microlitros
µg	Microgramas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
Sus	Sistema Único de Saúde
Ima	Instituto do Meio Ambiente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Uso etnobotânico de plantas como recurso terapêutico	16
1.2 Micro-organismos, feridas e antimicrobianos.....	19
1.3 Descrição botânica <i>C. nucifera</i> Linn (coqueiro-anão verde).....	24
1.4 Metabólitos secundários e atividades biológicas do <i>C. nucifera</i> Linn	25
1.5 Radicais livres e antioxidantes	26
1.6 Citotoxicidade.....	28
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Tipo de Estudo.....	33
3.2 Locais de realização	33
3.3 Etapas do estudo:	33
3.3.1 Material vegetal.....	33
3.3.2 Preparo dos extratos	34
3.3.3 Ensaio antimicrobianos <i>in vitro</i>	35
3.3.3.1 Ensaio antimicrobianos <i>in vitro</i> pela difusão em disco	36
3.3.3.2 Ensaio antimicrobianos <i>in vitro</i> pela perfuração em Ágar.....	38
3.3.3.3 Concentração inibitória mínima (CIM)	39
3.3.4 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de viabilidade celular / MTT	40
3.3.5 Avaliação da capacidade sequestradora de radicais livres	42
3.3.5.1 Avaliação qualitativa da capacidade sequestradora de radicais livres	42
3.3.5.2 Avaliação quantitativa da capacidade sequestradora de radicais livres (DPPH)	42
3.3.6 Peso seco das amostras do vegetal	44
3.3.7 Análise estatística.....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Rendimento do material vegetal	47
4.2 Rendimentos dos extratos brutos.....	47
4.3 Resultados dos ensaios antimicrobianos <i>in vitro</i>	48
4.3.1 Resultados dos ensaios antimicrobianos <i>in vitro</i> pela difusão em disco	48
4.3.2 Resultados dos ensaios antimicrobianos <i>in vitro</i> pela perfuração em Ágar	51

4.3.4 Concentrações inibitórias mínimas (CIM / MIC)	53
4.4 Resultados dos testes de citotoxicidade.....	56
4.5 Resultados da avaliação da capacidade sequestradora de radicais livres	59
4.5.1 Avaliação qualitativa da capacidade sequestradora de radicais livres:	59
4.5.2 Avaliação quantitativa da capacidade sequestradora de radicais livres	62
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	70
REFERÊNCIAS.....	73
APÊNDICE	92
APÊNDICE A - Revisão Integrativa submetida à publicação:	93
ANEXOS	108
ANEXO A - Cópia da aprovação do projeto pelo Comitê de ética em pesquisa/ Ufal	109
ANEXO B - POP microdiluição para concentração inibitória mínima.....	110
ANEXO C - Protocolo e POP de diluições para curva de calibração	112
ANEXO D - Protocolo de preparação dos extratos e DPPH	113
ANEXO E - Formulário de avaliação para difusão em Ágar.	115
ANEXO F - Formulário para avaliação da concentração inibitória mínima (MIC)	116
ANEXO G - Difusão em disco - Preparação dos discos teste com os extratos	117
ANEXO H - Meios e Reagentes utilizados / Preparo dos micro-organismos	118
ANEXO I - Declaração de reconhecimento e catalogação da espécie vegetal – IMA	120

1.1 Uso etnobotânico de plantas como recurso terapêutico

Plantas com propriedades terapêuticas têm sido utilizadas desde a antiguidade no tratamento de doenças que acometem o ser humano e suas propriedades curativas e tóxicas foram descobertas ao acaso durante a busca por alimento. O interesse por alternativas naturais atreladas ao aperfeiçoamento das técnicas de extração e identificação dos constituintes das plantas possibilitou elucidar princípios bioativos utilizados posteriormente em medicamentos de relevância mundial, dentre eles a morfina, a atropina e o ácido salicílico.¹⁻²

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem incentivado o uso de plantas com propriedades terapêuticas. No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) tem investido na aplicabilidade de terapias não convencionais na rotina dos serviços de saúde, para o tratamento e prevenção de agravos a saúde, como a instituição da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC/2006), que tem impulsionado a universalização do acesso ao Sistema Único de Saúde (Sus)³ e junto a criação da Relação Nacional de Plantas com Propriedades Terapêuticas de Interesse ao Sus (RENISUS/2009) constituída de espécies com potencial gerador de produtos para o Sus.⁴

Essas iniciativas são fomentadas pelo fato do Brasil deter a maior biosfera do planeta, com 55 mil espécies catalogadas, correspondendo a 22% das conhecidas no mundo. Destas, 10 mil são medicinais, aromáticas e úteis com apenas 10% dos vegetais brasileiros avaliados quanto a suas atividades biológicas.⁵⁻⁶

Propriedades terapêuticas de produtos naturais tem sido alvo de pesquisas que investigam as atividades biológicas de plantas medicinais orientadas pelo uso popular, como o alho (*Allium sativum* L.) que foi usado na forma de cataplasma para a cicatrização de feridas infeccionadas desde os tempos da Babilônia (3.000 anos a.C). Esta espécie é uma das 70 que se encontra na RENISUS.⁷

Médicos chineses também foram precursores na utilização de plantas e usavam os bolores para o tratamento de tumores e na cicatrização de feridas infeccionadas. Os Sumerianos curavam as feridas com emplastos feitos com vinho, cerveja, zimbro e ameixas.⁸ A banana (*Musa* spp) possui relato etnobotânico de ser utilizada *in natura* ou cozida para diarreias e pesquisas reunidas em revisão integrativa confirmam atividade anti-helmíntica.⁹

Florence Nightingale considerada a fundadora da Enfermagem moderna e referência na atualidade, usou várias plantas na forma de chás por via oral para tratar moléstias, com cautela na dose para não provocar intoxicação.¹⁰ A utilização de plantas pela Enfermagem brasileira remota de Ana Néri, que serviu de voluntária na mais sangrenta luta armada da

América do Sul – a Guerra do Paraguai (1865-70), quando fazia remédios caseiros, dentre eles um a base de pimentão amarelo como potente anti-inflamatório.¹¹

Pesquisadores brasileiros têm realizado estudos experimentais, inclusive com espécies vegetais, na busca de atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante destinadas ao tratamento de feridas, considerado problema de saúde pública.¹²⁻⁴ Em outros países também, como no Paquistão¹⁵ - *Berberis linceum*, na Austrália¹⁶ - mel e óleo essencial derivados da *Lavandula x allardii*; no Brasil, screening fitoquímico identificou ação cicatrizante e antimicrobiana em extratos da banana da terra (*Musa sapientum*).¹⁷

Cresce a participação da Enfermagem na pesquisa básica e na busca das potencialidades biológicas de plantas com vistas a novos fitoterápicos, práticas alternativas, ensaios pré-clínicos e clínicos. Observada nos esforços do Núcleo de pesquisa e inovação tecnológica em tratamento de feridas - Lptf / Ufal¹⁸, no grupo de práticas alternativas da USP¹⁹, no grupo que busca de larvicidas da Universidade Federal de Goiás²⁰, no estudo de produtos naturais aplicados à saúde da Faculdade de tecnologia e ciências de Salvador,²¹ no grupo de fitoterapia da Universidade Federal de Pernambuco²² dentre outros.

Em consulta ao diretório dos Grupos de Pesquisas no Brasil/CNPq²³ em dezembro de 2012, com os descritores *Enfermagem* and *plantas* obteve-se como resultado onze grupos, destes, seis realizam ensaios experimentais. Associando-se *Enfermagem* and *ensaios* foram encontrados três grupos, um fluminense voltado para pesquisas em feridas²⁴, um do Mato Grosso do Sul na área de genética²⁵ e um do Maranhão que investiga doenças transmissíveis por meio de pesquisas clínicas²⁶. Com os descritores *Enfermagem* and *experimental* encontrou-se dois grupos, um de Sergipe e um de Mato Grosso do Sul; cujas linhas de pesquisas investigam lesão traumática²⁷ e stress²⁸ respectivamente. Foram desconsiderados os grupos repetidos no cruzamento dos descritores *ensaios* e *experimental*.

A utilização de plantas com segurança ainda é restrita às que foram exploradas cientificamente²⁹ e que apresentem garantia da qualidade do material botânico, não apenas aos aspectos físico-químicos, mas também no aspecto microbiológico, visto que materiais vegetais podem conter grande número de fungos e bactérias, pertencentes à microbiota natural ou introduzido durante a manipulação. Esta contaminação pode ser intensificada com o tempo e não somente comprometer o material em si, mas também o usuário.³⁰

Na área de Enfermagem, observa-se que os modelos de pesquisas das disciplinas básicas foram suprimidos pelos da psicologia e sociologia com distanciamento da área médica e das disciplinas básicas comuns no campo multiprofissional da saúde, para cultivar modelos

de pesquisa exploratória, social, histórica e teórica. Isto se fez necessário pelo contexto histórico e pela busca da identidade própria da profissão, associado ao modelo de assistência com escassa mão de obra sob supervisão de uma enfermeira.³¹

A integração da ciência básica à pesquisa em Enfermagem é um tema em expansão nos Estados Unidos da América (EUA) e pouco explorada no Brasil. Entretanto, a busca pela prática profissional subsidiado pelo conhecimento científico e baseado em evidências tem conduzido enfermeiros brasileiros a participarem da produção e inovação do conhecimento básico; nessa perspectiva, tem-se a pesquisa experimental com *Chamomilla recutita* (Camomila) que apresentou atividade antiinflamatória frente à flebite por infusão intravenosa de quimioterápicos, o estudo do sabão de *Aloe vera*¹³ como redutor das reações tóxicas por radiação e o estudo que fez análise microbiológica em kits para aerossol.³¹⁻⁴ Em nossa escola/UFAL, estudos com espécies vegetais têm sido realizadas quanto às atividades antimicrobianas, cicatrizante, antiinflamatória, capacidade sequestradora de radicais livres e testes de toxicidades em caráter pré-clínico *in vitro* e *in vivo* com vistas à expansão clínica.

Além de consumir novas tecnologias, acredita-se que o enfermeiro deva transformar sua prática diária, gerando inovações, estimulando para que sejam testadas e sistematizadas através de pesquisas científicas. Na década de 1990, um projeto desenvolvido pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), gerou 33 produtos, nove desses foram patenteados, demonstrando o potencial da enfermagem na produção de tecnologias. No período de 1990-2009, foram encontradas na base de patentes do INPI 25 solicitações de registro relacionadas à área de enfermagem. Observa-se que as necessidades básicas do usuário relacionadas à higiene e assepsia lideram (36%) das invenções patenteadas, seguidas pela administração de medicamentos (28%) e conforto do paciente (12%). Partindo da premissa que estas necessidades demandam tempo e esforço físico do profissional.³²

Respostas aos grandes enigmas da humanidade, como o mapeamento do genoma humano, o complexo delineamento da estrutura biomolecular e muitos processos fisiopatológicos foram explicados graças aos conhecimentos oriundos de pesquisas nas ciências básicas; dessa forma, é imprescindível que também a Enfermagem, enquanto ciência avance nestas questões com perspectivas de ampliação do conhecimento em múltiplas áreas.

Observa-se a expansão da Enfermagem na pesquisa básica, através da revisão integrativa que reuniu a produção de pesquisas experimentais em enfermagem realizadas no período de 1997 a 2010 com buscas na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) com o descritor “experimental research in nursing” onde foram encontrados 6.022 estudos na MEDLINE, 39

no LILACS, 04 no IBECs, 01 na base especializada MedCarib e 03 no Acervo da biblioteca da Organização Pan-Americana de Saúde.^{35-6.}

No que se refere ao uso de plantas na prática da assistência em Enfermagem a Resolução do Conselho Federal de Enfermagem/COFEN nº 197/1997, na área de fitoterapia, “Estabelece e reconhece as terapias alternativas como especialidade e/ou qualificação para o enfermeiro”. Correlacionam-se terapias alternativas à utilização de plantas com propriedades medicinais. Estudo realizado no Programa Saúde da Família (PSF) identificou a importância da Enfermagem para a adesão ao uso de fitoterápicos pelos usuários, visto que tratamentos alternativos no atendimento primário a saúde é inquestionavelmente benéfico à população.³⁷⁻⁸ Dentre os quais, chás anti-hipertensivos, laxantes, excitantes e tranquilizantes.

A atividade de plantas com propriedades terapêuticas contra processos infecciosos tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas na busca de novos compostos, principalmente em decorrência da resistência das bactérias aos tratamentos convencionais.³⁹ Neste enfoque, existe a iniciativa de um grupo de pesquisadores enfermeiros da Universidade Federal de Alagoas que desenvolve pesquisas com espécies vegetais da flora alagoana na busca por atividade antimicrobiana e cicatrizante de feridas com foco na pesquisa básica experimental nas modalidades *in vitro* e *in vivo*, dentre os publicados, estão: o estudo do potencial antimicrobiano dos extratos da *Zeyheria tuberculosa*¹⁴, do óleo do *C. nucifera*⁴⁰, o estudo das atividades antimicrobiana e cicatrizante da *Piper hayneanum*⁴¹ e os estudos de citotoxicidade de extratos das Polygonaceae⁴², *Merremia Aegyptia*⁴³ e *Swartzia apetala Raddi*.⁴⁴

Para tanto, foi implantado em 2010 o Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas (LpTF/Ufal/) onde desenvolvem-se pesquisas com alunos de mestrado e da graduação com apoio financeiro de agências de fomento como a Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de Alagoas (FAPEAL), CNPq e Banco do Nordeste do Brasil (BNB). Com atividades multidisciplinares em parceria com outros laboratórios da UFAL.

1.2 Micro-organismos, feridas e antimicrobianos

A ação do microorganismo patógeno se disseminar e desencadear eventos biológicos que promovem o adoecimento do organismo agredido resulta em infecção. Vários micro-organismos, principalmente, as bactérias têm apresentado resistência à maioria dos antimicrobianos disponíveis. Para tanto, inovações tecnológicas como a procura de novos fármacos de origem vegetal ou sintética agregados às medidas de biossegurança são sugeridas para o problema da multirresistência.³⁹

As infecções estafilocócicas podem ser graves em recém-nascidos, idosos, pacientes cirúrgicos, com câncer, diabéticos e imunossuprimidos. O *S. aureus* é uma bactéria Gram positiva presente na microbiota normal do corpo humano, porém atua numa gama de infecções. Causa doenças superficiais, invasivas e tóxicas, inclusive artrite séptica. É a principal causadora de infecções em feridas cirúrgicas e sua importância clínica desponta devido ao aumento de infecções hospitalares graves causadas por cepas multirresistentes.⁴⁵⁻⁶

O aparecimento de cepas de *S. aureus* resistentes a metilina – MRSA e com reduzida susceptibilidade à vancomicina (VISA - *S. aureus* vancomicina-intermediário resistente) têm sido preocupação em todo o mundo. Esta situação agrava-se em relação à facilidade de transmissão deste patógeno e sua resistência ao grande número de antibióticos. Além da resistência cruzada a todos os antibióticos beta-lactâmicos e metilina, também apresenta-se resistente aos macrólidos, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifampicina e quinolonas, permanecendo os glicopéptidos como uma das poucas opções terapêuticas. Contudo, o uso extensivo de glicopeptídeos levou ao surgimento de cepas glicopeptideorresistentes.⁴⁷⁻⁹

Diante deste cenário, é evidente a necessidade de novos antimicrobianos e mais potentes. Assim, duas novas classes foram introduzidas nas últimas décadas: as oxazolidinonas e os lipopéptidos cíclicos. Esses agentes são daptomicina (lipopeptídeo cíclico) e linezolida (oxazolidinona).⁵¹⁻³ No entanto as buscas são progressivas inclusive através de modificação molecular como estratégia promissora na concepção e desenvolvimento de análogos de drogas com melhor biodisponibilidade, maior atividade intrínseca e menor toxicidade.⁵⁴

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram negativa aeróbia podendo crescer anaerobicamente na presença de nitrato e versátil nos requerimentos nutricionais, o que lhe permite crescer em meios simples; a maioria produz pigmentos como a piocianina e a piorrubina. É um dos principais agentes de infecção em indivíduos imunodeprimidos e no ambiente hospitalar. Sua importância clínica baseia-se na difícil erradicação da infecção, consequência da virulência, resistência natural e adquirida a muitos antibióticos. Destaca-se pela formação de camada de aspecto mucóide - *slime*, importante na formação de biofilmes. Os principais mecanismos de resistências são a produção de B-lactamases e enzimas que modificam antibióticos das classes dos aminoglicosídeos e carbapenemases, considerado no Brasil, como problema endêmico.⁵⁵

Considerada oportunista, a *P aeruginosa*, no ambiente hospitalar, coloniza os pulmões de praticamente todos os pacientes com fibrose cística e em todos os casos prevê infecções invasivas. É mais devastador em queimados, e representa um dos principais agentes de infecção hospitalar em casos de pneumonia, infecção urinária, infecção de feridas cirúrgicas e bacteremias; além dos sistemas respiratório, nervoso central, urinário, endocardite, infecções superficiais, de tecidos moles, ósseos e nas articulações.⁵⁶

Estudo da avaliação da suscetibilidade antimicrobiana da *E. coli* revelou 40% de resistência à ampicilina e 40% de resistência intermediária à associação ampicilina-sulbactam. Estes percentuais alertam as autoridades sanitárias e comunidade científica a fim de buscar alternativas de combate a este patógeno⁵⁶ Uma pesquisa identificou um novo antibiótico lipopeptídeo cíclico (Battacin) contra bactérias Gram-negativas multirresistentes, inclusive para *E. coli*; no entanto não esgota o problema diante do histórico de resistência adquirida.⁵⁷

Candida albicans é o agente patogênico mais prevalente dentre os fungos em seres humanos e a principal fonte de risco de morte nas fungemias nosocomiais. Responsável por 50 a 70% de todas as infecções invasivas do gênero, o que caracteriza sua alta virulência, produzem toxinas e enzimas extracelulares que constituem os fatores mais importantes para o desencadeamento de infecções.⁵⁸

A colonização por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ou *Candida albicans* em feridas são agravantes para o retardo na cicatrização, bem como para o quadro clínico do paciente.

A ferida consiste na interrupção da continuidade do tecido corpóreo provocado por trauma ou desencadeada por afecção que acione as defesas do organismo.⁵⁹ Feridas incisionais, geralmente, cicatrizam por primeira intenção quando as bordas estão aproximadas, entretanto infecções em seu leito provocam deiscências e atrapalham a cicatrização que passa a acontecer por terceira intenção, quando as bordas estão equidistantes, o que promove maior tempo nas hospitalizações e torna o tratamento mais oneroso.⁶⁰ O tratamento de feridas vai além da realização do curativo, estende-se a escolha adequada da substância ativa e viável do ponto de vista socioeconômico e conforto individual.⁶¹

Feridas infectadas são as que sofrem colonização microbiana e conseqüentemente têm sua cicatrização retardada. As feridas que não progridem através dos estágios normais da cicatrização têm etiologias diversas e geralmente ocorrem em pacientes com condições predisponentes, tais como doença venosa, arterial, neuropatia e imunossupressão, tornando o

hospedeiro susceptível a infecção.⁶²⁻³ Um estudo identificou o gênero *Pseudomonas* como o patógeno presente na maioria das feridas crônicas com média de seis meses de tratamento.⁶⁴

As infecções por micro-organismos retardam ou impedem a cicatrização de feridas, particularmente na forma de biofilmes que são compostos de micróbios embebidos numa matriz polimérica que impede a ação de antimicrobianos e lhes permite resistir às defesas do hospedeiro. O estudo de biofilmes introduziu o novo paradigma de infecções microbianas crônicas visto que se constituem em comunidades polimicrobianas com relações sinérgicas entre os micróbios que alteram a virulência e patogenicidade destes.⁶⁵⁻⁷

A ocorrência de feridas crônicas têm crescido consideravelmente, impulsionada pelo envelhecimento da população, aumento dos casos de obesidade e diabetes mellitus.⁶⁸ O mercado dispõe de diversos produtos que apresentam bons resultados no tratamento de feridas, entretanto com o complicador financeiro, os preços desses curativos industrializados torna-os inacessível a maioria da população. Atualmente, uma placa de hidrocolóide 10x10cm custa em média R\$2,50 e a unidade da pomada Saf gel® de 85g chega a custar R\$75,00.

As feridas crônicas, com período superior a três semanas, custam ao sistema de saúde dos EUA em torno de 25 bilhões de dólares por ano.⁶⁹ No Brasil, este custo é de R\$ 98,90 a 180,00 reais por dia com base em estudo realizado em tratamento ambulatorial. O custo para o sistema de saúde nos casos de internação para os portadores de úlceras de pressão é consideravelmente maior, em média 45% mais elevado que o ambulatorial.⁷⁰ A incidência de úlcera por pressão é considerada como indicativo da qualidade dos serviços de saúde. Quando ocorre a infecção da úlcera o problema é ainda maior, pois aumenta o tempo de internação, expõe o paciente a morbimortalidade, além da sobrecarga de trabalho para Enfermagem e aumento nos custos hospitalares.⁷¹

Tendo em vista que, no Brasil, aproximadamente 100 milhões de pessoas não têm acesso a medicamentos industrializados, esses dados estimulam pesquisas que busquem em espécies vegetais com propriedades medicinais, alternativas para o tratamento das afecções do ser humano e, em especial, aquelas que afetam o sistema tegumentar, como as feridas.⁷²⁻³

A introdução dos antimicrobianos na sociedade contribuiu decisivamente para a diminuição das taxas de morbimortalidade, particularmente, das doenças infecciosas e bacterianas. A partir do uso da penicilina e sulfonamidas ocorreu crescente progresso no isolamento e desenvolvimento de agentes antimicrobianos utilizados na terapia das doenças decorrentes da ação dos micro-organismos.⁷⁴ Com o avançar das tecnologias e pesquisas, novos agentes antimicrobianos foram descobertos e produzidos em escala industrial.

Nesta perspectiva, classificam-se os antimicrobianos como “específicos” - aqueles que agem sobre o organismo invasor e não afetam o hospedeiro e “inespecíficos” - aqueles que matam ou inibem o crescimento microbiano. Outra classificação adotada separa antimicrobianos em bactericidas ou fungicidas, quando matam os micro-organismos, e bacteriostáticos ou fungistáticos, quando atuam apenas impedindo o crescimento.⁷⁴ O uso indiscriminado dos antimicrobianos junto ao aumento da prevalência das doenças imunossupressoras tem causado resistências aos antimicrobianos.⁷⁵

Ao descobrir a penicilina em 1929, Fleming foi o primeiro observador da resistência natural de micro-organismos aos antibióticos, descrevendo que bactérias como a *P. aeruginosa* não eram inibidas pelo antibiótico. A causa desta resistência natural foi descoberta por Abraham e Chain em 1940 quando demonstraram em extratos de *E. coli* a enzima capaz de destruir a ação da penicilina. Kirby, em 1944, constatou que alguns *S. aureus* mostravam-se resistentes à penicilina devido à penicilinase.⁷⁶⁻⁹

Em 1946, nos EUA, cerca de 5% de *Staphylococcus* isolados de pacientes eram resistentes à penicilina. Em 1949 esta resistência podia ser notada em 29% dos germes isolados em hospitais norte-americanos; em 1950 atingia 50% e em 1959 era cerca de 80%. No Brasil, acima de 80% dos *S. aureus* isolados de pacientes hospitalizados e cerca de 70% dos isolados de pacientes da comunidade apresentam resistência natural às penicilinas, ampicilina e amoxicilina.⁸⁰⁻²

Embora o *S. aureus* apresente susceptibilidade à ação de várias drogas ativas contra Gram-positivas (tais como penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol), também é conhecido pela elevada capacidade de desenvolver resistência a todas; determinada por mutações em seus genes e/ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias.⁸³ O surgimento de novos antibióticos semi-sintéticos, tais como metilina, isoxasolil penicilinas, cefalosporinas e lincosamidas foi sucedido pelo aparecimento de *Staphylococcus* multirresistentes.^{46,84}

Cepas multirresistentes têm sido grandes desafios para a comunidade científica. Com vistas a minimizar este problema, observa-se crescente interesse em estudos por alternativas terapêuticas e busca de produtos naturais com propriedades antimicrobianas e cicatrizantes; favorecido pelo rico potencial da biodiversidade brasileira.⁸⁵

1.3 Descrição botânica *C. nucifera* Linn (coqueiro-anão verde)

O *C. nucifera* L. tem importância mundialmente reconhecida, tanto para consumo "*in natura*" quanto para fins industriais. No Nordeste brasileiro, este vegetal encontrou condições edafoclimáticas satisfatórias para seu cultivo e está presente em mais de 86 países situados nos trópicos. Seu fruto é utilizado de diversas formas, principalmente na indústria alimentícia e cosmética, na medicina Tailandesa é usado como planta medicinal há séculos.⁸⁶

Pesquisa com algumas partes do fruto do *C. nucifera* L. identificou ação antimicrobiana, antiinflamatória, antinociceptiva, antitumoral, antioxidante e hidroeletrólítica. Como por exemplo, na concha desta planta foi encontrada principalmente lignina e celulose, com composição química muito semelhante à madeira e adequado para a extração de compostos fenólicos, os quais subsidiam as atividades descritas.⁸⁷

Testes fitoquímicos de extratos do fruto de *C. nucifera*, indicaram presença de taninos condensados, flavononas, flavononóis, flavonóis e xantonas. Estes constituintes exercem atividade antimicrobiana, antiviral, antiulcerogênica, anti-hepatotóxica, hipolipidêmica, antineoplásica, antialérgica e anti-inflamatória.⁸⁸ Na casca de coco maduro seco foi comprovada atividade antifúngica contra *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *M. audouinii*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans* e *T. violaceum*. A atividade foi atribuída principalmente ao alto teor de compostos fenólicos.⁸⁹

Frente a estas constatações o *C. nucifera* tem potencial para desenvolvimento de pesquisas que busquem maiores evidências e amplitude de suas atividades biológicas.

O *C. nucifera* Linn é uma palmeira, da família *Palmae* (Arecaceae), conhecida popularmente no Brasil como coqueiro (Figura 1). É uma planta de região tropical, oriunda do continente asiático, mais precisamente da região Indo-Malásia. Foi introduzida no Brasil pelos portugueses com boa adaptação.⁹⁰

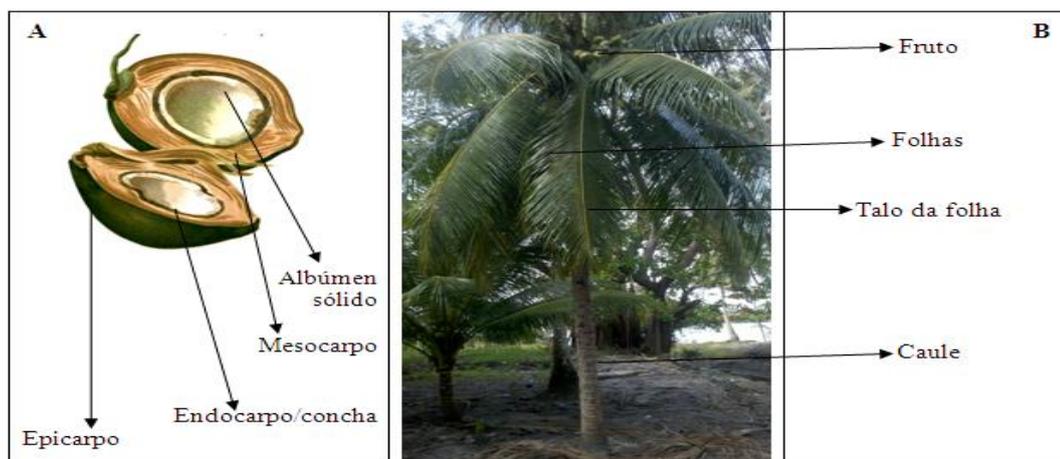


Figura 1 - Partes da espécie vegetal *C. nucifera* L. Fruto (A) e Planta (B).

Fonte: (A) Blanco FM, abr, 2009. (B) Autora da pesquisa, dez. 2012.

O estado de Alagoas possui consideráveis áreas de plantio do *C. nucifera* L. e ocupa o décimo lugar, dentre os dez maiores produtores de coco do país.⁹⁰

Diante do conhecimento já produzido acerca do uso medicinal do fruto, albúmen sólido (carne branca), albúmen líquido (água de coco) endocarpo (concha) e mesocarpo (fibra), fazem-se necessários estudos das outras partes do *C. nucifera* Linn, folhas, pecíolo (talo), caule e raiz, ainda pouco exploradas na área medicinal, inclusive o de origem alagoana.

1.4 Metabólitos secundários e atividades biológicas do *C. nucifera* Linn

A probabilidade de sobrevivência de espécies pode ser aumentada pela presença dos metabólitos secundários, pois são responsáveis pelas atividades biológicas encontradas nas plantas que resultam de rotas biossintéticas, decorrentes do mecanismo de defesa dos vegetais contra as adversidades que estão sujeitas no meio ambiente e das relações interespecíficas. Além disso, alguns metabólitos constituem importantes compostos que absorvem a luz ultravioleta evitando que as folhas sejam danificadas.⁹¹⁻²

Plantas com propriedades terapêuticas produzem diferentes classes de metabólitos secundários - alcalóides, taninos, flavonóides, saponinas e outros; e o fazem em diferentes proporções, visto que alguns fatores podem influenciar na composição química dos vegetais, tais como habitat, sazonalidade, índice pluviométrico, radiação ultravioleta, altitude, temperatura, idade, água e solo (micro e macronutrientes), herbivoria e ataque de patógenos, composição atmosférica, ciclo circadiano; enfim, dependem das características edafoclimáticas e do seu potencial genético.^{47,93}

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. Alguns metabólitos secundários derivam não apenas de um desses intermediários, mas são resultado da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato, como é o caso das antraquinonas, flavonoides e taninos condensados.⁹²

Há relatos etnobotânicos que folhas jovens são mastigadas até formar pasta e são aplicadas em feridas para interromper sangramentos.⁹³ Esta parte é formada por três porções: pecíolo, bainha e lamina e seus elementos químicos descritos até o momento, nas folhas, são: nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg), cálcio (Ca), sódio (Na), cloro (Cl), enxofre (S), boro (B), manganês (Mn), ferro (Fe), cobre (Cu), molibdênio (Mo), zinco (Zn) e alumínio (Al), os quais podem estar agregados a esqueletos dos metabólitos secundários, tais como ligninas, flavonóides, flavanonas, alcalóides, terpenos e outros.⁹⁴

Estudos mostram compostos químicos encontrados nas folhas do *Cocos nucifera* L. como os ácidos para-hidroxibenzóico, ferúlico, 4-cumarínico, 4-hidroxibenzaldeído, vanílico; flavonóides, principalmente polifenóis, pequenos peptídeos e outros compostos bioativos, além de α -celulose, hemicelulose e lignina.⁹⁵⁻⁶ Do fruto foram isolados triterpenos, saponinas, taninos condensados, catequinas, epicatequinas, β -procianidinas, compostos fenólicos, flavonoides, ácidos 4-hidroxibenzóico, vanílico, ferúlico, clorogênico e ascórbico.⁹⁷⁻¹⁰⁰

1.5 Radicais livres e antioxidantes

Os radicais livres são substâncias formadas endogenamente no organismo humano e apesar de possuírem função fisiológica, podem causar lesões. Seus efeitos cumulativos são responsáveis pelo envelhecimento e estão envolvidos em doenças degenerativas, como catarata, câncer, aterosclerose, isquemia cerebral, disfunções cardiovasculares e outras.¹⁰¹

Espécies reativas de oxigênio como o radical hidroxila (OH), ânion radical superóxido (O_2^-) e hidroperoxila (ROO) causam danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas, além de atacarem as cadeias de ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno, o que desencadeia o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares.¹⁰¹⁻²

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo ser enzimáticos ou não, tais como o α -tocoferol (Vitamina E), β -caroteno, ácido ascórbico (Vitamina C) e compostos fenólicos.¹⁰³⁻⁴

Os compostos fenólicos das plantas se enquadram em diversas categorias, tais como fenóis simples, ácidos fólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas, e outros. Dentre os quais, os flavonoides são os mais estudados como antioxidantes.¹⁰³⁻⁸

Em extratos de diferentes partes do *C. nucifera* L. foram encontrados flavonóides, principalmente polifenóis e ácido ferúlico que é potente como antioxidante neutralizador de radicais livres que causam danos oxidativos nas membranas celulares e DNA. Esses compostos possuem um núcleo fenólico e um lado com cadeia estendida conjugada devido ao qual é capaz de se ligar aos radicais fenoxi que o estabelece como potente antioxidante e atua como fotoprotetor diminuindo a absorção dos raios UVA e UVB, além de redutor de eritemas causados na pele devido à exposição à radiação.¹⁰⁹

Os antioxidantes são classificados em: primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos (Tabela 1).¹¹⁰

Tabela 1 - Classificação dos antioxidantes, suas funções e exemplos. Maceió-AL, 2012.

Tipo	Função	Exemplos
Primários	Removem ou inativam os Radicais livres.	Compostos fenólicos: butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT).
Sinergistas	Aumentam a atividade de compostos primários.	Alguns antioxidantes primários em combinações.
Removedores de oxigênio	Capturam O ₂ livre, por reações químicas estáveis.	Vitamina C.
Biológicos	Removem oxigênio ou compostos altamente reativos do sistema alimentício.	Enzimas: glucose oxidase, superóxido dismutase e catalase.
Agentes quelantes	Complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica.	Ácido cítrico, fosfato e o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA).
Mistos	Incluem compostos de plantas e animais que são utilizados como antioxidantes em alimentos.	Proteínas hidrolisadas e flavonoides.

Fonte: adaptado de Silva, 2008.

As plantas são eficientes em sintetizar compostos orgânicos, enquanto que os animais e micro-organismos são dependentes da dieta, *a priori*, para obtê-los. A célula vegetal possui capacidade de produzir moléculas complexas, oriundas basicamente, de moléculas simples como nitrogênio amínicos e dióxido de carbono por rotas específicas em que moléculas simples são transformadas em produtos primários e secundários.¹¹⁰

1.6 Citotoxicidade

O objetivo fundamental de estudos de citotoxicidade é o de conhecer os aspectos de morbi-mortalidade de agentes químicos sobre o organismo, representado por manifestações clínicas e/ou alterações laboratoriais. Investigação da toxicidade de extratos de plantas, por métodos *in vitro* é o percurso mais recomendado, um indicador para a condução de experimentos pré-clínicos.¹¹¹

De acordo com o Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, todo e qualquer fitoterápico, ou droga vegetal, em estudo, deve, obrigatoriamente, ser submetido a teste toxicológico.¹¹² Substâncias ativas que se apresentam citotóxicas podem ser avaliadas quanto à atividade antitumoral, inseticida, larvicida ou cercaricida ou ainda, receber modificações estruturais e serem novamente testadas quanto a citotoxicidade.¹¹¹

A redução da função mitocondrial, a com perda da permeabilidade, as mudanças na morfologia e replicação celular são o que permeiam, *a priori*, os testes de citotoxicidade. As células respondem por meio de diferentes mecanismos bioquímicos à presença de compostos, sendo a perda da função mitocondrial uma das respostas mais comuns e que é utilizada como sinal precoce de citotoxicidade.¹¹³

Toxicidade é o fator que limita a liberação e consumo de fármacos, portanto, a análise de toxicidade associada à atividade biológica de compostos é fundamental para determinar sua aplicação estabelecendo-se o índice terapêutico¹¹⁵.

Em respeito à ética e pela redução dos custos financeiros, o uso de animais para estudos toxicológicos deve ser evitados, melhor elegendo os testes *in vitro* de toxicidade. Esses ensaios fornecem informações sobre diferentes funções ou compartimentos celulares¹¹⁶.

Direcionada pela afinidade e prosseguimento da linha de pesquisa básica adotada desde a graduação com o trabalho de conclusão de curso, pioneiro na pesquisa experimental da escola de Enfermagem da UFAL, no qual foi testada a capacidade cicatrizante do hidróxido de magnésio em ferida cutânea incisional *in ratos*. E principalmente, estigada pela

necessidade de identificação de propriedades terapêuticas em plantas para corroborar com o combate aos micro-organismos e agravos oxidativos que afetam o ser humano com crescente morbimortalidade pela multirresistência microbiana e doenças degenerativas; neste cenário, emergiu o interesse de investigar as propriedades terapêuticas das partes do *Cocos nucifera* L. ainda pouco exploradas, coletado em região alagoana a fim de ampliar o conhecimento da flora local e em respeito à segurança na utilização de novos produtos, destas inquietações culminou a seguinte pergunta de pesquisa: Os extratos brutos das folhas, pecíolo e cascas do caule do *C. nucifera* L. possuem atividade antimicrobiana, capacidade sequestradora de radicais livres e não são citotóxicos?

Optou-se pela pesquisa pré clínica experimental *in vitro* como dissertação de mestrado, pelo fato de que a pesquisa básica é considerada etapa inicial, que necessita ser percorrida para subsidiar pesquisas clínicas, *in vivo*. Atrelada a incipiente quantidade de enfermeiros na área pré-clínica “de bancada”. Nesse contexto, busca-se a participação do enfermeiro para além de usuário de novas tecnologias e, seu engajamento no desenvolvimento de inovações tecnológicas,⁴⁵ para a promoção da saúde da população, com ações que possam ser implementadas pelo Sus e cujos resultados contribuirão, posteriormente, para a inovação da prática clínica da Enfermagem.

A perícia adquirida nos métodos utilizados neste estudo é facilitadora para a continuidade de pesquisas básicas na Enfermagem alagoana.

2.1 Objetivo geral

- Investigar as atividades antimicrobiana, citotóxica e capacidade sequestradora de radicais livres dos extratos brutos etanólicos das folhas, pecíolo e casca do caule do *C. nucifera* Linn (coqueiro anão verde) *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos frente às bactérias Gram positiva: *Staphylococcus aureus*, Gram negativas: *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e ao fungo *Candida albicans*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos ativos;
- Verificar *in vitro* a citotoxicidade dos extratos;
- Identificar a capacidade sequestradora de radicais livres.

3.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo pré-clínico de abordagem quantitativa do tipo experimental, no qual foram testados extratos brutos da folha, pecíolo da folha e casca do caule do *C. nucifera* Linn, desde a coleta e preparo dos materiais vegetais a análises laboratoriais.

Este estudo consistiu na execução de ensaios *in vitro*, antimicrobianos por difusão em Ágar e determinação da concentração inibitória mínima - CIM por microdiluição frente a bactérias Gram positiva, Gram negativas e fungo; averiguação da capacidade sequestradora de radicais livres por análise qualitativa e quantitativa; teste de citotoxicidade pelo ensaio de viabilidade celular pelo método da conversão do sal MTT.

3.2 Locais de realização

Laboratório de Pesquisas em Tratamento de Feridas/LpTF da Escola de Enfermagem e Farmácia/Esenfar em parceria com o Instituto de Química e o Laboratório de Farmacologia e Imunidade/LAFI, todos da Universidade Federal de Alagoas (Ufal).

3.3 Etapas do estudo:

3.3.1 Material vegetal

As folhas, pecíolo e casca do caule do *C. nucifera* Linn foram coletados na segunda quinzena do mês de setembro às 16 horas, em dia de sol parcialmente encoberto por nuvens. A coleta foi realizada com foice afiada, em coqueiro com idade de cinco anos, no estado de Alagoas (Figura 2A), na região de restinga no bairro de Massagueira, município de Marechal Deodoro/AL no litoral sul alagoano a 6 Km de Maceió (Figura 2B), situado em terreno de manguezal arenoso, nas proximidades da Lagoa Mundaú e do Oceano Atlântico (Coordenadas geográficas S 509°44'082" e O 35°49'957").

Amostras do material vegetal (folha e inflorescência) foram encaminhadas para reconhecimento por botânica do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas (IMA), onde as exsicatas encontram-se catalogadas sob MAC nº 55.997. Foram respeitadas as recomendações de coleta tais como idade da planta, inspersão da qualidade do material e identificação das coordenadas geográficas.¹¹⁷



Figura 2 - Local de coleta do *C. nucifera* L. (A) Alagoas. (B) Marechal Deodoro.

Fonte: (A) Ache tudo e região, 2012. B) Flimar blog spot, 2010.

3.3.2 Preparo dos extratos

As amostras do vegetal (folhas, cascas do caule e pecíolo) da espécie *C. nucifera* Linn, após secagem à temperatura ambiente e trituração em moinho de facas foram pesadas em balança semi-analítica RADWAG® WTB2000 calibrada e acondicionadas em vidros de 3 litros para extração, pelo método de maceração, mediante a submersão das amostras vegetais em solvente polar: álcool etílico hidratado (EtOH) a 98% (Figura 3A).

As folhas receberam extração, também com o solvente metanol PA (CH₃OH) adicionado ao etanol a 98% na proporção 1:2 respectivamente. Este método de extração é feito a frio, o que requer mais segurança para o manipulador. Para uma única extração usa-se geralmente solvente polar (MeOH ou EtOH) e para mais de uma extração utiliza-se três tipos de solventes, iniciando pelo de menor polaridade (hexano – C₆H₁₂), seguido pelo de polaridade moderada (clorofórmio - CHCl₃ ou diclorometano - CH₂Cl₂) e na sequência o polar (MeOH, EtOH ou H₂O).¹¹⁸

Após 30 dias de submersão da primeira extração das amostras, foram submetidas à dupla filtração, por gaze fixada por elástico na borda do vidro extrator e em funil com papel filtro. Adicionou-se EtOH à 98% no material vegetal restante e deixado em descanso por três dias, repetindo-se a filtração. Esse procedimento em triplicata (1^a com trinta dias, a 2^a e 3^a com cinco dias de submersão) foi realizado para obtenção do máximo da extração. Ao término da 3^a extração, os resíduos do vegetal foram descartados.¹¹⁹

Sequencialmente, após cada etapa de extração, procedeu-se a concentração das soluções em evaporador rotatório (Rotaevaporador IKA® RV 10 basic FISATOM) a 121 rpm em temperatura de 40-50 °C e pressão de 650 mmHg (Figura 3B). Foram porcionados 300 mL para cada ciclo de rotaevaporação e o extrato acondicionado em potes de vidro esterilizados e

pesados em balança analítica. Os extratos acondicionados foram deixados destampados para secagem em estufa em temperatura de 40 °C ou sobre estufa de aquecimento à vapor em temperatura de 40 °C (Figura 3C).

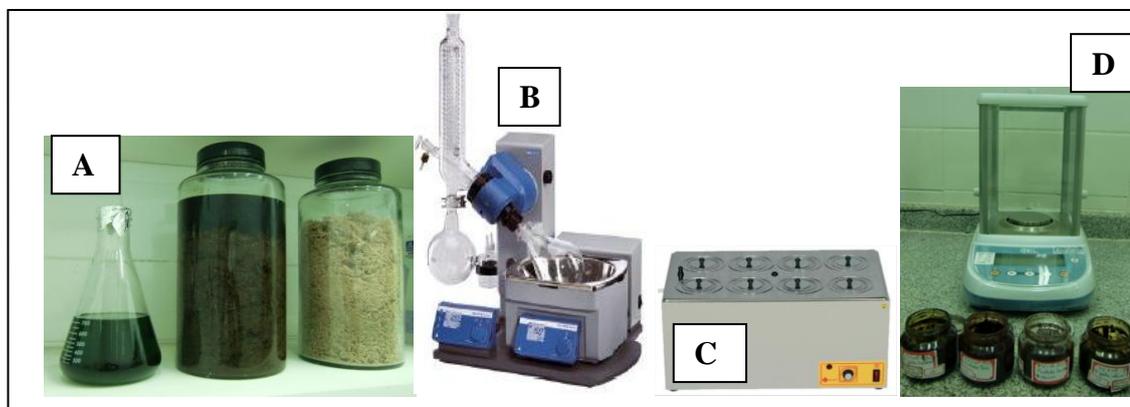


Figura 3 - Preparo dos extratos: Extrator (A); Evaporador rotatório; (B) Estufa à vapor (C); Extratos do *C. nucifera* L. e Balança analítica (D).

Fonte: (A e D) Autora da pesquisa, 2012. (B) Biovera, 2011. (C) Cial, 2012.

O preparo dos extratos ocorreu no Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (IQB/Ufal) e no Laboratório multidisciplinar de Farmácia/Esenfar/Ufal.

Os quatro extratos brutos foram extraídos sucessivamente em triplicata com o mesmo solvente recuperado. Foram preparados extratos brutos etanólicos das folhas (lâmina), pecíolos e casca do caule da referida espécie vegetal, obtendo-se o total de três extratos brutos etanólicos (folhas, cascas do caule e pecíolo) e um extrato etanol/metanol (folhas) na proporção 2:1 respectivamente.

Estes extratos brutos foram submetidos a ensaios *in vitro* para avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em Ágar, determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela microdiluição, investigação da atividade citotóxica pelo método de viabilidade celular pela conversão do sal de tetrazólio (MTT) e a capacidade sequestradora de radicais livres por ensaios qualitativo e quantitativo.

3.3.3 Ensaios antimicrobianos *in vitro*

No Brasil, os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).¹²⁰

A solubilização das amostras vegetais foi conduzida considerando-se a facilidade ou dificuldade da mesma ser dissolvida com auxílio de banho termoultrassônico. Para tanto,

foram implementados vários testes,¹²¹ conforme apresentado a seguir: a) Teste de solubilização em água: alicotou-se amostra do extrato com bastão de vidro e homogeneização em água destilada em vidro tipo relógio; b) Teste de Solubilização em Propilenoglicol PA (C₃H₈O₂): macerou-se 1 g do extrato em 2 gotas de Propilenoglicol, com bastão em vidro tipo relógio; em seguida adicionou-se 1 mL de SF 0,9%; c) Teste de Solubilização em Cremophor + Propilenoglicol: solubilizou-se 1 g do extrato em 2 gotas de Cremophor + 1 mL de Propilenoglicol PA despejando-se em frasco ampola e lavando o vidro de relógio de 1 em 1 mL até completar 5 mL de Propilenoglicol para obter solução a 20% . d) Teste de Solubilização em Cremophor + SF 0,9%: macerou-se 1 g do extrato em 2 gotas Cremophor + 1 mL de SF 0,9%, sendo esta a solubilização usada, por ter sido a que melhor solubilizou as amostras.¹²² O biomonitoramento antimicrobiano *in vitro* foi realizado pelo método de difusão em Ágar por meio dos testes de difusão em disco e perfuração em placa. Sequencialmente foi determinada a CIM dos extratos pela microdiluição em caldo.¹²³⁻⁴

Os experimentos antimicrobianos *in vitro*, com os extratos brutos das folhas, pecíolo das folhas e casca do caule do *C. nucifera* L., foram realizados por meio de análises de inóculos contendo micro-organismos com cepas padrão **Gram positiva**: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) **Gram negativas**: *Escherichia coli* (CCCCD/ E008 e ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 e CCCD P003), e ao **fungo** *Candida albicans* (ATCC 10231 e CCCD/CC001), pela difusão em disco e perfuração em Ágar. Foi identificada a CIM dos extratos ativos pelo método de microdiluição em caldo.¹²⁵⁻⁶ Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.3.3.1 Ensaios antimicrobianos *in vitro* pela difusão em disco

O teste de difusão em Ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico no qual o micro-organismo é desafiado contra a substância biologicamente ativa em meio sólido de cultura e relaciona-se ao tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo contra a concentração da substância testada.¹²⁷ A aplicação do método de difusão se limita a espécies de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. A avaliação é comparativa frente ao padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona (halo) de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento microbiano.¹²⁷

Inóculos com os micro-organismos foram preparados na concentração de aproximadamente 10⁸ UFC/mL correspondente ao padrão 0,5 na escala de McFarland (Figura

4) e semeado em placas de Ágar Müeller-Hinton para bactérias e Sabouraud-Dextrose para os fungos. Em cada placa foram depositados três discos testes impregnados com 20 μL da amostra teste, um disco de controle negativo e um disco controle positivo.

Solução estoque foi solubilizada em etanol PA. Discos estéreis de papel filtro de 6 mm de diâmetro foram impregnados com 20 μL da solução estoque, que corresponde a 1000 $\mu\text{g}/\text{disco}$. Como controle positivo para os fungos foram utilizados discos impregnados com 20 μL de miconazol.¹²⁸ Nos ensaios com bactérias foram usados discos padronizados de gentamicina (10 $\mu\text{g}/\text{disco}$) e de ciprofloxacina (5 $\mu\text{g}/\text{disco}$).¹²⁹ O controle negativo foi feito com discos impregnados com o solvente utilizado na solubilização das amostras.



Figura 4 - Escala de MacFarland. Tubo 5 ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL).

Fonte: Bastos, 2008.

Conforme protocolo de preparação dos discos teste com os extratos (Anexo G), os experimentos foram realizados em triplicata, de acordo com o método de difusão em disco. Os discos foram distribuídos na superfície das placas de Petri semeadas com os micro-organismos. Após a difusão dos extratos, as placas foram vertidas e incubadas a 36° C por 24 horas para bactérias, e a 28 °C durante 48 horas para os fungos.¹³⁰ A atividade inibitória das amostras foi avaliada pela formação de halo de inibição do crescimento dos micro-organismos em torno dos discos, mensurado com auxílio de um paquímetro.

O halo de inibição induzido pelos materiais testados foi comparado com os obtidos nos controles positivos. Os resultados foram expressos em termos de tamanho do diâmetro do halo de inibição do crescimento microbiano, conforme os seguintes critérios: menor que 9

mm → não ativo; 9 - 14 mm → parcialmente ativo; maior que 14 a 17 mm → ativo e maior que 17 mm → muito ativo.¹²³

A percentagem de inibição do crescimento foi calculada de acordo com a fórmula seguinte; considerado ativo quando o percentual de inibição $\geq 75\%$, moderadamente ativo quando % de inibição $\geq 25\%$ e < 75 e considerados inativos quando % de inibição $< 25\%$).¹³¹

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\Sigma \text{ halo de inibição da amostra}}{\Sigma \text{ halo de inibição do controle}} \times 100$$

3.3.3.2 Ensaios antimicrobianos *in vitro* pela perfuração em Ágar

O ensaio aconteceu conforme metodologia esquematizada na Figura 6. Em placas de Petri adicionaram-se 2 mL de Ágar Mueller Hinton para bactéria e Sabouraud Dextrose para fungos, confeccionando-se assim a camada-base, seguida da colocação de cinco ponteiras de 7 mm invertidas em pontos equidistantes para confecção de poços. Homogeneizado 100 μL da solução microbiana (10^8 UFC/mL) em 10 mL do meio e vertido na placa; após gelatização retirou-se as ponteiras e adicionou-se 50 μL do extrato a 10% em cada poço.¹³²⁻³

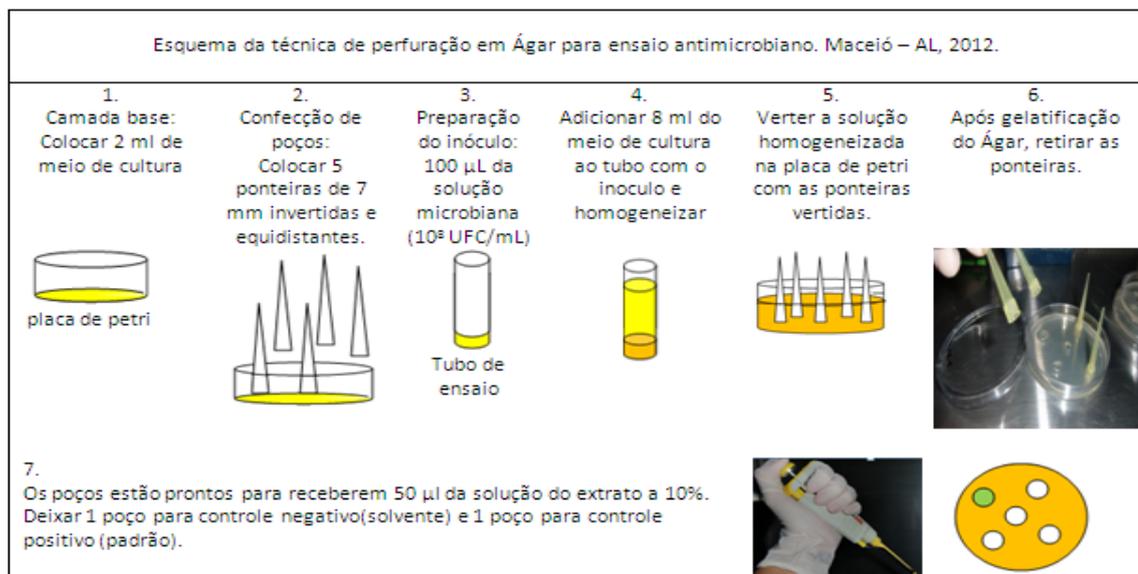


Figura 5 - Esquema Ensaio Perfuração em Ágar.

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

Foi utilizado como controle negativo duas gotas de cremophor homogeneizado em 1 mL de SF 0,9% e como controle positivo para as bactérias a Ceftriaxona (Gram positiva) e

Ciprofloxacina (Gram negativa) e o Miconazol para o fungo. Em seguida as placas foram incubadas em estufa a 36 °C por 24 horas para bactérias e 28 °C por 48 horas para fungos. Decorrido o período de incubação, mensuraram-se os halos de inibição com o auxílio de paquímetro.^{14,134}

A preparação do extrato a 10% (solução estoque) foi realizada com 1 g do extrato + 2 gotas de cremophor + 1 mL de SF 0,9%. Homogeneizado e macerado com bastão de vidro em um vidro de relógio. Despejado em frasco ampola e colocado em banho ultrassônico.¹²²

3.3.3.3 Concentração inibitória mínima (CIM)

A microdiluição é uma das técnicas mais utilizadas quando se deseja realizar triagem. Além de apresentar boa reprodutibilidade, possibilita a avaliação da atividade antimicrobiana e proporciona a determinação da CIM dos extratos. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato em µg/mL capaz de impedir o crescimento microbiano.¹²³

Os extratos vegetais que apresentaram atividade antimicrobiana para as cepas microbianas e halos de inibição iguais ou maiores que 9 mm nos ensaios de perfuração em Ágar foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo para a determinação da CIM em placas de 96 cavidades estéreis.

Foi utilizado o Protocolo de Microdiluição em Caldo *Müller Hinton* (Anexo B). Alíquota de 200 µL de cada extrato vegetal foi preparado na concentração de 2000 µg/mL, empregando-se um ml de SF 0,9% com duas gotas de cremophor como solvente na solubilização das amostras. Em seguida, os extratos solubilizados foram filtrados por filtros milipore 0,45 µm e inoculados nas colunas de 1 a 9 da linha A da placa de 96 poços. Os demais orifícios foram preenchidos com 100 µL de caldo *Müller-Hinton* (duas vezes concentrado).¹⁰² Alíquota de 100 µL do conteúdo de cada orifício da linha A foi transferido para linha B e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para a linha C, repetindo-se até a linha H, obtendo-se assim concentrações decrescentes dos extratos (1000 µg/mL- linha B; 500 µg/mL- linha C; 250 µg/mL- Linha D e sucessivamente).^{123, 134}

Os inóculos microbianos na concentração de 0,5 de McFarland (10^8 UFC/mL) foram diluídos 1/10 em solução salina estéril (0,9%) e desta diluição 5 µL (10^4 UFC/mL) foram depositadas em todos os orifícios das linhas A-H. Os orifícios das colunas 10, 11 e 12 foram destinados para os testes de controle do experimento. Os orifícios da coluna 10 foram reservados para o controle negativo da atividade inibitória do diluente, utilizado na solubilização dos extratos. Nesta coluna, a solução de 1 ml de SF 0,9% homogeneizado com 2

gotas de cremophor foi diluída em caldo Mueller-Hinton até a linha H e o mesmo inóculo microbiano foi acrescido.^{123,134}

Os orifícios da coluna 11 receberam apenas caldo Mueller-Hinton e o inóculo microbiano, possibilitando o controle positivo da viabilidade bacteriana e os orifícios da coluna 12 receberam apenas caldo Mueller-Hinton para a verificação da esterilidade da placa. As placas foram incubadas em estufa microbiológica a 36 °C por 18 horas. Decorrido este tempo foi acrescido a todos os orifícios 20 µL de solução aquosa de Cloreto 2,3,5 Trifenil Tetrazolium - TTC (VETEC) a 0,5%. As placas foram reincubadas por mais três horas para a análise qualitativa.^{123,134-5}

Após esta última incubação a presença da coloração vermelha nos orifícios foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório do extrato, enquanto a ausência da coloração vermelha foi considerada prova positiva da ação inibitória do extrato.

O TTC é um reagente comumente utilizado na detecção de metabólitos de células eucarióticas. Ele produz hidrônio (H^+) na sua forma reduzida formando o trifênil formazan que possui coloração vermelha, indicadora de atividade microbiana (Figura 7). Cada teste foi realizado em triplicata.

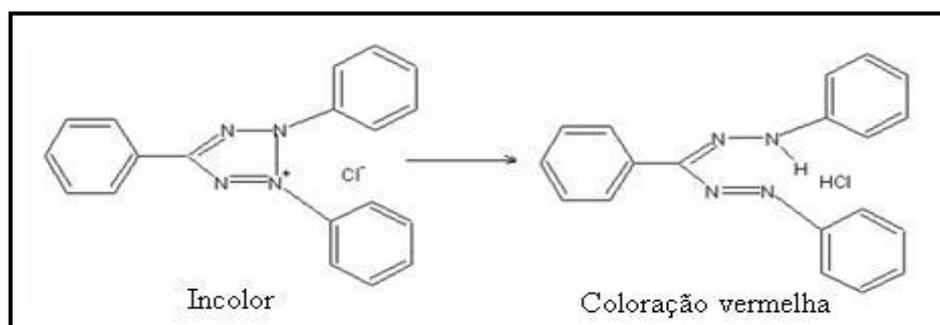


Figura 6 - Esquema de redução do Cloreto 2,3,5 Trifenil Tetrazolium (TTC).

Fonte: Vieira, 2008.

O grau de atividade foi determinado segundo os critérios:¹²³ a) CIM < 100 µg/mL: **ativo**; b) CIM = 100 < 500 µg/mL: **moderadamente ativo**; c) CIM > 500: **inativo**.

3.3.4 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de viabilidade celular / MTT

O objetivo deste teste de viabilidade é verificar o potencial citotóxico dos extratos. Utilizou-se a técnica colorimétrica com a solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que se baseia na verificação da atividade e integridade celular,

através da clivagem do sal de tetrazólio, de cor amarela, em cristais de formazan, de cor violeta pela enzima succinato desidrogenase presente nas células ativas.^{44,114-5, 133,162}

A quantidade de cristais formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração ao final da reação, maior é a viabilidade celular. A densidade óptica resultante do teste MTT foi determinada em espectrofotômetro. Este teste foi realizado em triplicata.¹³⁷

Realizados os testes com os extratos brutos do *Cocos nucifera* Linn nas concentrações de 2000, 1000, 200 e 100 µg/mL correspondentes a 2,0; 1,0; 0,2 e 0,1 % de solvente DMSO respectivamente. As amostras foram preparadas a partir de 0,030 g do extrato em eppendorf por balança analítica e solubilizado em 300 µL de DMSO PA com auxílio do Vortex, formando a solução de 100 mg/mL filtrada com miliporo de 0,22 µm e 13 mm.¹³⁸

Foram plaqueados, em placa de 96 poços, macrófagos da linhagem J774 na densidade de 2×10^5 células/poço, contadas e ajustadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Cada poço recebeu 200 µL do meio com as células. Nos poços testes foram acrescentados os extratos e a placa foi incubada em estufa a 37°, atmosfera úmida e 5% de CO₂ no modo *overnight* por 48hs para adesão dos macrófagos.^{137-8,40}

Após o período de incubação total (48 hs), o sobrenadante foi descartado e adicionado em cada cavidade 100 µL da solução de MTT (500 µg/mL) e reincubadas por 1 hora para determinar a viabilidade celular. Após esse período o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspendido com 100 uL de DMSO.

Para a quantificação do sal de formazan reduzido (coloração azul), as placas foram interpretadas em espectrofotômetro no comprimento de onda 550 nm.

Os poços controles consistiram de células cultivadas apenas com meio de cultura suplementado com 10% de SFB (controle positivo) e células cultivadas acrescidas do diluente DMSO (controle negativo). O grupo de células mortas (Controle positivo - três poços) foi obtido 1 hora antes da adição do MTT por meio da lise celular com a adição de 2 µL de Triton 100X para dissolver os cristais de Formazan. A viabilidade celular nos poços com os extratos foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controles.^{137-8,40}

Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade celular e o estado metabólico da célula a partir da redução do sal de tetrazólio a formazan. Avalia citotoxicidade.^{137-8,40}

3.3.5 Avaliação da capacidade sequestradora de radicais livres

3.3.5.1 Avaliação qualitativa da capacidade sequestradora de radicais livres

Todos os extratos brutos foram submetidos a ensaios para avaliação qualitativa da capacidade sequestradora de radicais livres frente ao radical sintético DPPH (Figura 7A)¹⁴⁰

As amostras dos extratos passaram por dissolução em Hexano (C₆H₁₂), Acetato de etila (AcOEt), Metanol (MeOH) e Clorofórmio (CHCl₃). Alíquotas de 2µL de cada extrato foram aplicadas através de capilares de vidro em cromatoplaças (Sílica gel 60 PF₂₅₄) e eluidas em sistemas de solventes adequados.¹⁴¹

Após evaporação dos solventes em temperatura ambiente aplicou-se o controle positivo [(+)-catequina (2 µL, 1mg/mL em CHCl₃)], conforme Figura 7B. As cromatografias foram imersas, durante 10 segundos, em solução metanólica do radical sintético DPPH a 0,4 mM e em seguida secas a temperatura ambiente. O surgimento de manchas amarelas sob fundo roxo nos Rfs das substâncias sugere atividade antioxidante. O princípio consiste em: DPPH + Radical livre = coloração roxa / DPPH – Radical livre = cor amarela.¹⁴¹⁻²

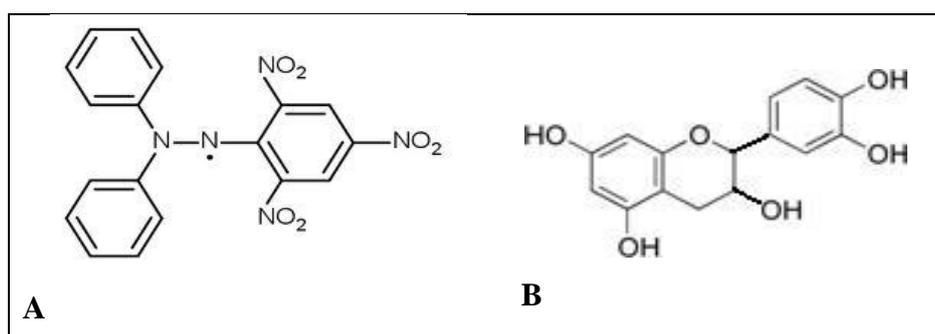


Figura 7 - Radical sintético: DPPH (A). Controle positivo: catequina (B).

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

3.3.5.2 Avaliação quantitativa da capacidade sequestradora de radicais livres (DPPH)

Os extratos brutos que apresentaram resultados positivos (mancha amarela) nos ensaios qualitativos foram submetidos a ensaios para avaliação quantitativa frente ao radical sintético DPPH, que é baseado na capacidade do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil em reagir com substâncias doadoras de H (DPPH• + [AH]_n ® DPPH-H + [A]_n) incluindo compostos fenólicos. Foi utilizado DPPH em metanol espectroscópico seguindo a técnica descrita e determinar as CI₅₀.¹⁴¹⁻²

Após obtenção da curva de calibração, alíquotas de 0,1 mL de cada concentração dos extratos foram colocadas em cubetas e adicionadas 0,9 mL da solução do radical DPPH (100

$\mu\text{mol/L}$). As soluções foram protegidas da luz, homogeneizadas e as leituras das diferentes concentrações (200 a 12,5 $\mu\text{g/mL}$) foram realizadas nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos.

As absorvâncias das soluções foram registradas contra o branco de Metanol espectroscópico. A percentagem de DPPH remanescente (DPPH_{REM}) no meio reacional foi obtida a partir da equação matemática da curva de calibração e dos valores de absorvância obtidos após 60 minutos de análise para cada concentração testada:¹⁴³

$$\% \text{DPPH}_{\text{REM}} = \frac{[\text{DPPH}]_{\text{T=t}}}{[\text{DPPH}]_{\text{T=0}}} \times 100$$

Onde:

$[\text{DPPH}]_{\text{T=t}}$ = concentração de radical DPPH no meio após a reação com o extrato.

$[\text{DPPH}]_{\text{T=0}}$ = concentração inicial de radical DPPH no meio (40 mg/mL ou 100 $\mu\text{mol/mL}$)

Os resultados de percentagens de radical DPPH remanescente versus as concentrações testadas (200 a 12,5 $\mu\text{g/mL}$) foram plotados, através do programa Microcal OriginPro 6.0. A quantidade de antiradical necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% (CI_{50}) foi obtida usando o modelo matemático $Y = a + b \cdot x$

Onde, x = concentração e Y = constante de Absorvância = 50%.

Obtenção da curva de calibração

Seguindo o Protocolo de Diluições para Curva de Calibração (Anexo C), nove concentrações (40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 $\mu\text{g/mL}$) foram preparadas a partir da solução estoque de DPPH em MeOH, na concentração inicial de 40 mg/mL (100 μmol). A absorvância de cada solução a 515 nm foi determinada utilizando cubetas de poliestireno com percurso óptico de 1cm, contendo 1 mL de solução. Foi utilizado espectrofotômetro UV/VIS modelo UV-mini-1240 Shimadzu e MeOH espectroscópico grau HPLC como branco.¹⁴²⁻⁴

As absorvâncias resultantes foram medidas em diferentes intervalos de tempo: 0, 15, 30, 45 e 60 minutos de reação. Para a construção da curva de calibração foram utilizadas as médias de absorvância obtidas versus as concentrações usadas (40 a 1 mg/L) através de análise de regressão linear utilizando o software Microcal OriginPro 6.0, para obtenção do desvio padrão (DP) e coeficiente de correlação $R = 0,9997$ das amostras testadas.¹⁴²⁻⁴

Preparo das soluções dos extratos brutos

As soluções estoques foram preparadas a partir de 2 mg de extrato bruto solubilizados em 10 mL de metanol. De cada extrato, foram testadas as concentrações 200,

150, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL, seguindo o protocolo de concentração dos extratos (Anexo D). O ácido gálico e o BHT foram utilizados como antioxidantes padrões, submetido ao mesmo procedimento experimental: preparados a 40 µg/mL em MeOH espectroscópico.¹⁴²⁻⁴

Análise cinética da reação

Analisada na concentração de 100 µg/mL para extratos e padrões como valor de referência par obtenção dos gráficos (DPPH_{REM} x tempo). As análises tiveram duração de 60 minutos, com frequência a cada 15 min. Os resultados foram comparados com os padrões e classificados em cinética lenta ou rápida.¹⁴²⁻⁴

3.3.6 Peso seco das amostras do vegetal

O peso seco de cada parte (caule, folha e pecíolo) do *C. nucifera* L. foi obtido pelo método de liofilização que resulta no rendimento vegetal após sua desidratação, para na sequência identificar os rendimentos dos extratos. Este método oferece estabilidade por longo período de armazenagem. Para sua obtenção, 200 g das partes do *C. nucifera* L. foram pesados em balança analítica WTB 200 e congeladas em temperatura de $-8 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72 horas. Em seguida colocados nos vidros específicos do Liofilizador, permanecendo no aparelho Thermo Savant (Micro Modulyo, vácuo VLP 200 Valupump) por 72 horas, até a total desidratação.¹⁴⁵

Realizado no Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais - LPQPN do Instituto de Química e Biotecnologia.

3.3.7 Análise estatística

Os resultados dos ensaios antimicrobianos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey; os níveis de significância entre os grupos experimentais e controles foram feitos utilizando-se o Teste T de Student.

Para os testes de citotoxicidade foi utilizado o software Excel e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) do Prisma e aplicado teste de Dunnett cujos resultados da média da triplicata foram expressos em gráficos.

Nos testes de Avaliação Quantitativa da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres utilizou-se o software Microcal OriginPro 6.0. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de três determinações. Os dados foram submetidos à análise de variância de um fator (ANOVA one-way).

Adotou-se nível de significância $p < 0,05$ expressos como média de desvio padrão.¹¹⁰

3.3.8 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi aprovada com nº: 018748/2011-71 pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Ufal (Anexo A).

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados *in vitro* com células da linhagem J774.

4.1 Rendimento do material vegetal

Folha, pecíolo e caule do *C. nucifera* Linn, foram submetidas ao cálculo de rendimento de sua matéria após a desidratação de 200 g *in natura* pela técnica de liofilização. Rendimentos em grama e em percentagem estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Rendimento das amostras desidratadas de *C. nucifera* L. Maceió-AL, 2012.

Partes do Cocos <i>nucifera</i> Linn.	Peso “in natura”	Rendimento desidratado/ peso seco	
	(g)	(g)	(%)
Folha	200	88,40	44,20
Pecíolo da Folha	200	52,80	26,40
Caule	200	46,50	23,25

Fonte: Autora da pesquisa, dez. 2012.

Verifica-se que a espécie vegetal possui viabilidade de utilização no que se refere ao rendimento de sua matéria após a desidratação. Para este achado, foram registradas as condições edafoclimáticas na coleta do vegetal, quando no final do mês de setembro, os índices pluviométricos estão reduzidos na região do nordeste alagoano, coincidindo com o início da primavera.

4.2 Rendimentos dos extratos brutos

Os extratos brutos foram obtidos a partir das seguintes quantidades do vegetal desidratadas: folha extraído em etanol/metanol 2:1 (170,90 g); folha etanólica (200 g); pecíolo da folha etanólica (182,00 g) e caule etanólico(226,66 g).

Após extração e filtração de plantas secas, usualmente, obtem-se extratos líquidos que, se levados a resíduos por evaporação, fornecem quantidade de material sólido na proporção de 30% aproximadamente, com variação de 5-50% dependente da solubilidade dos seus metabólitos.¹⁴⁶

Os maiores rendimentos dos extratos brutos desta pesquisa com *C. nucifera* Linn foram obtidos das folhas extraídas pela solução de etanol/metanol (2:1) respectivamente, com percentagem de 28,1% considerado na média do bom rendimento, e dentro desta estimativa renderam as demais partes do *C. nucifera* Linn; valores específicos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Rendimentos dos Extratos brutos de *Cocos nucifera* L. Maceió-AL, 2012.

Peso seco (g)	Extratos	Rendimentos	
		(g)	(%)
200,00	Folha (EtOH)	21,10	10,60
170,90	Folha (EtOH/MeOH 2:1)	43,40	28,10
182,00	Pecíolo da Folha (EtOH)	19,40	10,70
226,66	Caule (EtOH)	21,40	9,50

Fonte: Autora da pesquisa, dez. 2012.

Quando comparados com estudo da mesma família Arecaceae e outras espécies vegetais, por exemplo, os extratos etanólicos de folhas de *Qualea grandiflora* e raiz de *Copernicia prunifera*, no qual foram obtidos rendimentos de 9,8 e 4,6 % respectivamente¹²³ pode-se perceber o relevante rendimento das folhas, pecíolo e caule do *C nucifera* Linn. Estes percentuais de rendimentos viabilizam seu uso com sustentabilidade. Atrelado a isto, as quantidades produzidas foram mais do que suficiente para a realização dos experimentos.

4.3 Resultados dos ensaios antimicrobianos *in vitro*

Pesquisas na busca por novos tratamentos fitoterápicos que auxiliem profissionais da saúde no tratamento das doenças são imprescindíveis para a melhoria do acesso da população aos medicamentos, à inclusão social e regional, ao desenvolvimento industrial e tecnológico, e uso sustentável da biodiversidade brasileira.¹⁴⁷ Além disso, atrelados ao combate à resistência microbiana e ao relato etnobotânico das propriedades biológicas e terapêuticas¹⁴⁸; foram realizados testes antimicrobianos de difusão em disco, perfuração em Ágar e determinação da concentração inibitória mínima, com os extratos brutos do *Cocos nucifera* L. cujos resultados são corroborativos no combate ao *Stafilococos aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

4.3.1 Resultados dos ensaios antimicrobianos *in vitro* pela difusão em disco

Os quatro extratos brutos foram avaliados frente às bactérias *S. aureus*; *P. aeruginosa* e *E. coli*; e ao fungo *C. albicans*, na concentração de 1.000 µg/disco pela técnica de difusão em disco.

Frente ao *S. aureus* (Figura 8), apenas o extrato da pecíolo apresentou atividade, no entanto, forte atividade antimicrobiana com percentual de inibição do crescimento em 76,5%. Este valor frente à bactéria Gram positiva é considerado elevado quando correlacionado com os parâmetros existentes^{131, 146, 149-50} e significativa, pois apesar de fazer parte da microbiota

normal do corpo humano, o *S. aureus* é um patógeno que atua numa gama de infecções, dentre elas em feridas cirúrgicas, com maior gravidade em indivíduos imunocomprometidos; intensificada a problemática pelas cepas resistentes emergentes.¹⁴²

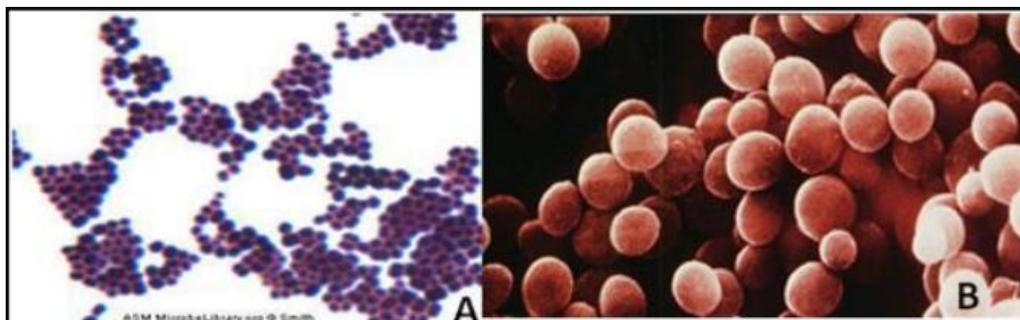


Figura 8 - *S. aureus*. Corado pelo método de Gram (A). Micrografia eletrônica (B).

Fonte: A) Smith, 2007. B) Todar K, 2012.

Até a década de 60 o *S. aureus* era sensível à penicilina, porém, cepas resistentes tornaram-se problema de saúde pública. A criação do beta-lactâmico sintético (metecilina) foi a solução encontrada; porém, surgiram os *S aureus resistentes a meticilina-MRSA*, e apresentaram resistência a todos os beta-lactâmicos. A vancomicina passou a ser utilizada e em 2002 surgiram os primeiros registros de resistência.^{46,77}

Diante desta trajetória de resistência, fazem-se necessárias alternativas antimicrobianas para este patógeno. A forte atividade inibitória apresentada pela pecíolo da folha do *Cocos nucifera Linn* parece ser uma opção promissora.

Dos quatro extratos testados frente à bactéria Gram negativa. *P aeruginosa*, o extrato etanólico/metanólico (2:1) das folhas foi considerado ativo com percentual de inibição de 76%. (halo de inibição $\geq 75\%$), o extrato etanólico da pecíolo foi moderadamente ativo com halos 29,4% (inibição $\geq 25\%$ e $< 75\%$). Os extratos etanólicos do caule e folha não apresentaram halo, portanto inativos (inibição $< 25\%$),¹³¹ conforme explicitado na Tabela 4.

Outra classificação restrita à dimensão do halo formado pelo extrato remete que, os extratos brutos das folhas etanólico/metanólico (2:1) e pecíolo etanólico do *C. nucifera L.* foram ativos contra *P aeruginosa* (halos ≥ 9 mm)¹⁴² e apenas o extrato da pecíolo foi ativo para *S aureus*. Esta classificação foi adotada no estudo que testou o extrato da *A. macrocarpa* frente ao *S. aureus* e obtiveram sensibilidades com halos de inibição entre 19 a 25 mm.⁵⁴

Estes resultados são compatíveis com os descritos em estudos, nos quais a atividade antibacteriana contra Gram positivas apresentaram, em geral, halos de inibição maiores do

que os das Gram negativas devido a maior susceptibilidade das Gram positivas, pois só possuem uma camada externa de peptidoglicano que não é barreira eficaz.^{77, 86, 131}

Os resultados encontram-se expressos em médias da triplicata dos halos de inibição do crescimento microbiano, na Tabela 4.

Tabela 4 - Halos de inibição do crescimento microbiano pelos extratos brutos do *C. nucifera* L. por difusão em disco (1000 µg/disco). Maceió-AL, 2012.

Micro-organismos	Média dos Halos de inibição (mm)				Controle Positivo
	Extratos brutos (1000 µg/disco).				
	Folha EtOH	Folha EtOH/MeOH 2:1	Pecíolo da folha EtOH	Caule EtOH	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,0	0,0	13,0	0,0	17 ^B
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,0	26,0	10,0	0,0	34 ^A
<i>E. coli</i> CCCD E008	0,0	0,0	0,0	0,0	34 ^A
<i>C. albicans</i> CCCD/CC0001	0,0	0,0	0,0	0,0	21 ^C

^ACiprofloxacina 5µg; ^BGentamicina 10µg, ^CMiconazol 50µg.

Fonte: Autora da pesquisa, dez. 2012.

Nenhum dos extratos do *C. nucifera* L. inibiu a Gram negativa *E. coli*. Compatível com os resultados obtidos em pesquisa que relata que bactérias Gram negativas, como *E. coli* e *P. aeruginosa* podem oferecer barreira na permeabilidade, devido à composição química de sua parede celular.^{77, 151-2}

Os achados deste estudo corroboram com a pesquisa realizada na Índia, que utilizou outra parte desta mesma espécie vegetal, na qual a atividade antimicrobiana da raiz do *C. nucifera* foi demonstrada frente aos mesmos micro-organismos aqui testados.¹⁵³

As atividades antimicrobianas encontradas nos extratos brutos das folhas e pecíolo do *C. nucifera* L. são relevantes e estimulam a busca por atividade bactericida em outros micro-organismos Gram positivos e Gram negativos; visto que a descoberta de biocomponentes de plantas com atividade antimicrobiana pode levar a terapias opcionais.

4.3.2 Resultados dos ensaios antimicrobianos *in vitro* pela perfuração em Ágar

O extrato da folha do *C. nucifera* Linn extraído por etanol/metanol (2:1) inibiu o crescimento de *S. aureus* (Figura 9) com média dos halos de inibição de 21 mm; valor este, aproximado do Controle Positivo – Ceftriaxona com 26,5 mm. Apresentou também atividade bactericida para *P. aeruginosa* (Figura 10) com halo de 12 mm, enquanto o Controle Positivo: Ciprofloxacina halo de 34 mm.

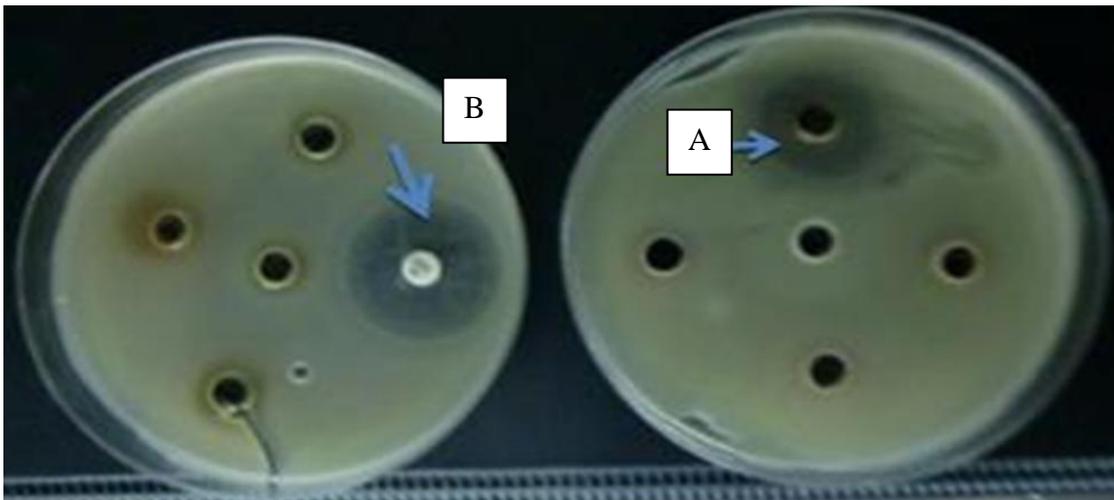


Figura 9 - Inibição de *S. aureus*. Halo de 21 mm do extrato etanólico/metanólico (2:1) das folhas do *C. nucifera* L. (A). Controle Ceftriaxona - halo 26 mm (B).

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

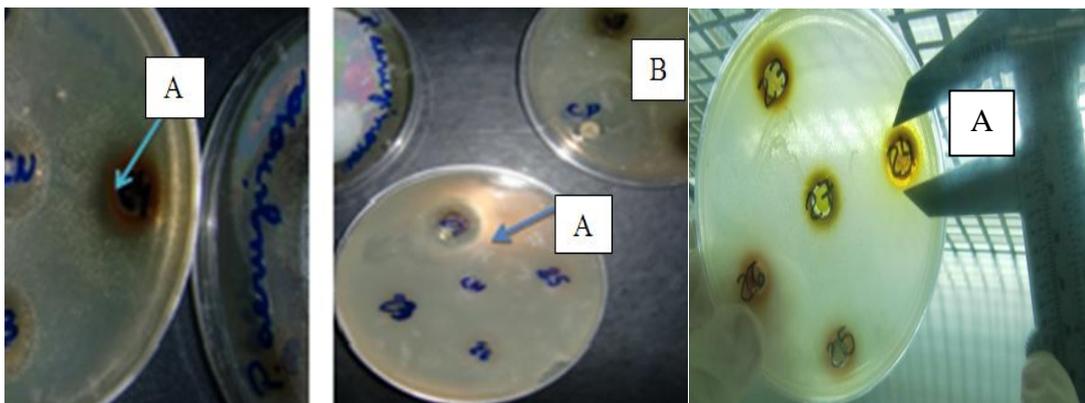


Figura 10 - Inibição de *P. aeruginosa*. Halos 12 mm pelo extrato etanólico/metanólico (2:1) das folhas do *C. nucifera* L.(A). Controle Ciprofloxacino - halo 34 mm (B).

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

Os resultados frente à Gram negativa foram positivos (halo de inibição de 12 mm) visto que *P. aeruginosa* apresenta resistência conferida por: degradação enzimática do medicamento, pouca expressão de proteínas de membrana, resistência a diferentes

antimicrobianos como cefalosporinas e carbapenêmicos, alteração do sítio de ação; vias metabólicas alternativas e diminuição da concentração intracelular do antimicrobiano (diminuição da permeabilidade, alteração de sistemas de transporte na célula, afluxo ativo – eliminação do medicamento por hiper-expressão de bombas de efluxo).¹⁵¹

Os testes realizados com os extratos etanólicos do caule, pecíolo e folha etanólica a 10% contra: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans* não apresentaram atividade antimicrobiana nos ensaios de perfuração em Ágar (Tabela 5).

Tabela 5 - Halos de inibição do crescimento microbiano pelos extratos brutos do *C. nucifera* pela técnica de perfuração em Ágar. Maceió-AL, 2012.

Micro-organismos	Média dos halos de inibição (mm)				
	Extratos brutos a 10%				CP
	Folha EtOH	Folha EtOH/MeOH 2:1	Pecíolo da folha EtOH	Caule EtOH	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,0	21	0,0	0,0	26,5 ^A
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,0	12	0,0	0,0	34 ^B
<i>E. coli</i> CCCD E008	0,0	0,0	0,0	0,0	34 ^B
<i>C. albicans</i> CCCD/CC0001	0,0	0,0	0,0	0,0	21 ^C

CP= Controle Positivo: ^ACeftriaxona 30µg; ^BCiprofloxacina 5µg; ^CMiconazol 50µg.

Fonte: Autora da pesquisa, dez. 2012.

A ausente atividade inibitória dos extratos sobre a bactéria Gram-negativa *E. coli* pode estar relacionada com as diferenças estruturais que estas bactérias apresentam em relação às Gram-positivas. Por exemplo, por possuírem parede celular com membrana dual em forma de envelope complexo, o que lhe confere proteção e maior resistência.¹⁵⁴

A atividade seletiva em Gram negativas também foi observada no estudo que testou extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* e identificou sensibilidade de *P. aeruginosa* e *Proteus mirabilis* ao extrato e resistência para *E. coli*, levantando a hipótese de que pode existir características específicas da *E. coli* que a tornam resistentes aos extratos.¹⁵⁵

Os resultados dos testes antimicrobianos pela perfuração em Ágar são valiosos, pois, os extratos brutos das folhas e pecíolo do *C. nucifera* apresentaram efeito inibidor do crescimento de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa seletivo.

4.3.4 Concentrações inibitórias mínimas (CIM / MIC)

A microdiluição é uma das técnicas mais utilizadas para triagem antimicrobiana. Apresenta boa reprodutibilidade e proporciona a determinação da CIM. Sua leitura auxiliada pelo reagente cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio (TTC) eficiente na detecção do metabólitos de células eucarióticas; produz hidrônio (H⁺) na sua forma reduzida formando o trifenil formazan que possui coloração vermelha, indicador de atividade bacteriana.¹⁵⁶

Foram realizados ensaios de microdiluição em eppendorfs (Figura 11) e placas de 96 poços (Figura 12) com os extratos ativos nos ensaios de difusão em Ágar: folhas e pecíolo do *C. nucifera* Linn a partir da concentração de 20 mg (10%), frente aos micro-organismos sensíveis: *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Tabela 6).

Tabela 6 - Avaliação da menor concentração inibitória do crescimento microbiano (MIC) dos extratos brutos do *C. nucifera* Linn. Maceió-AL, 2012.

Micro-organismos	Extratos brutos			CC	CN
	Folha EtOH	Folha EtOH/MeOH 2:1	Pecíolo da folha EtOH		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	00	Ativo a 5% (10mg)	Ativo a 5% (10 mg)	+	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	00	Ativo a 10% (20mg)	Ativo a 10% (20mg)	+	-

CC= controle de crescimento; CN= controle negativo; CE= controle de esterilidade.

Fonte: Autora da pesquisa, dez. 2012.

Observa-se a atividade inibitória do crescimento de *S. aureus* pelos extratos etanólico da pecíolo e folha etanólica/metanólica (2:1) do *C. nucifera* L, na concentrações de 10% (20mg/mL) a 5% (10mg/mL). Tais sensibilidades devem ser exploradas; a fim de combater esta Gram positiva que tem um importante marcador de patogenicidade, por ser coagulase

positiva - capacidade de coagular plasma que é a principal responsável por infecções⁴⁶ e desde o início da era antimicrobiana demonstra capacidade de resistir à ação dos antibióticos e quimioterápicos antinfeciosos⁷⁷.

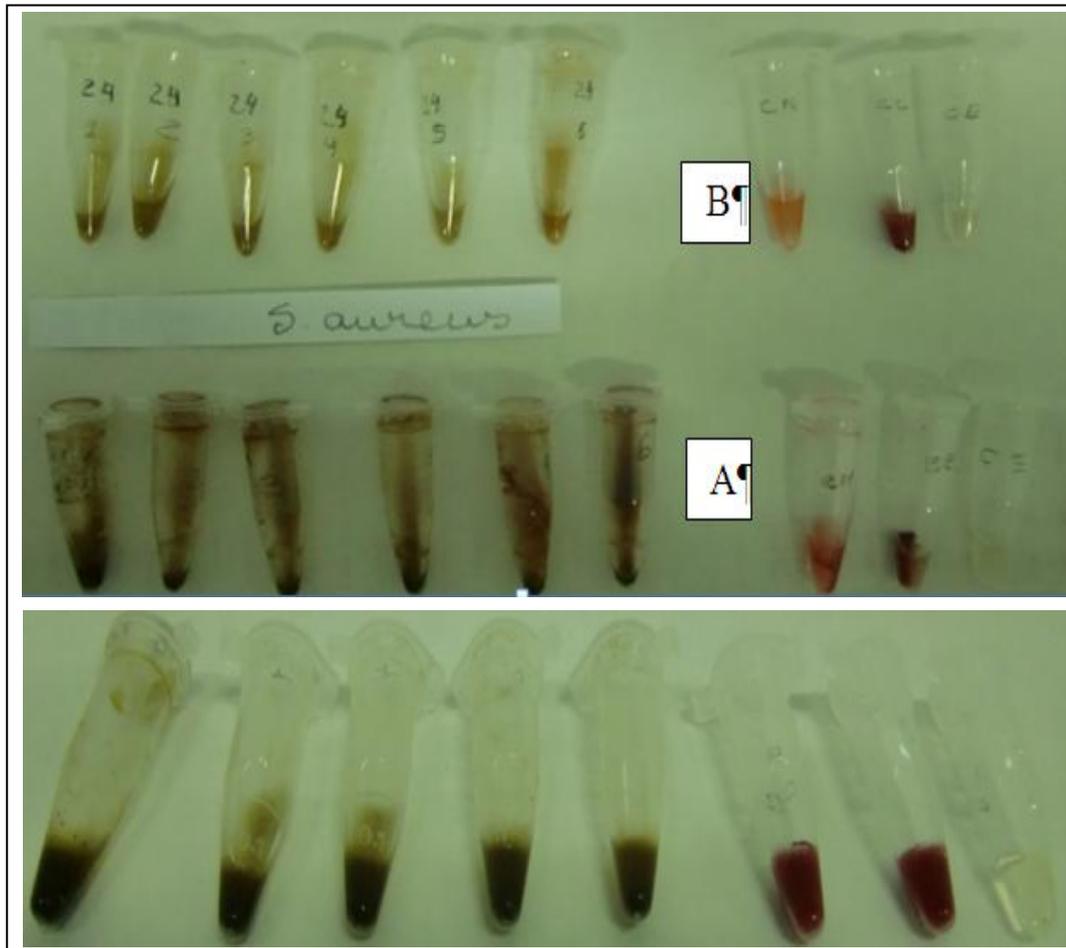


Figura 11 - Eppendorfs. Inibição do crescimento de *S. aureus* pelos extratos do pecíolo EtOH (A) e da folha EtOH/MeOH (B) do *C. nucifera* L. MIC em 10 mg (5%)

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

Em comparação com outros estudos antimicrobianos com *S. aureus*, dentre eles, o realizado em 2009 que avaliou o potencial antimicrobiano e antifúngico de *Coutarea latiflora* (Rubiaceae) pela técnica de microdiluição e verificaram que a CIM do extrato em metanol para *S. aureus* ficou entre 500 a 700 µg/mL.¹⁵⁷ Percebe-se que a MIC apresentada pelo extrato do *Cocos nucifera* Linn é elevada, no entanto ativa; correlacionada ao escore que considera plantas que apresentam valor de CIM inferior a 600 mg/mL como ativas, entre 600 a 1.500 mg/mL são moderadamente ativas, e as que apresentam CIM maior que 1.600 mg/mL são consideradas fracamente ativas.^{142, 136}

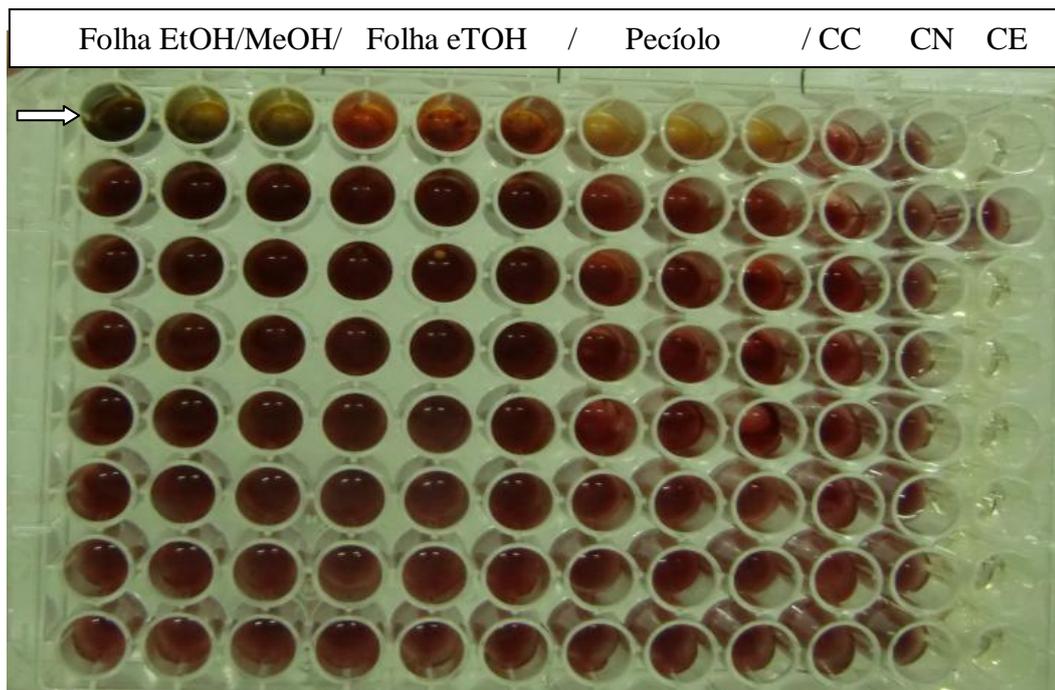


Figura 12 - Placas de 96 poços: MIC em 20mg frente a *P. aeruginosa* pelos extratos das folhas em EtOH/MeOH e pecíolo EtOH do *C. nucifera* L.

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

Neste escore, os extratos etanólico do pecíolo e etanólico/metanólico (2:1) da folha foram ativas frente a *P. aeruginosa* (Figuras 13 e 14). Este patógeno está associado à infecção e insuficiência pulmonar, principalmente, em indivíduos com fibrose cística, o que o torna responsável pela maior causa de morbidade e mortalidade neste grupo.¹³¹



Figura 13 - Eppendorf: MIC do pecíolo EtOH frente a *P. aeruginosa*.

Fonte: Autora da pesquisa, dez. 2012.

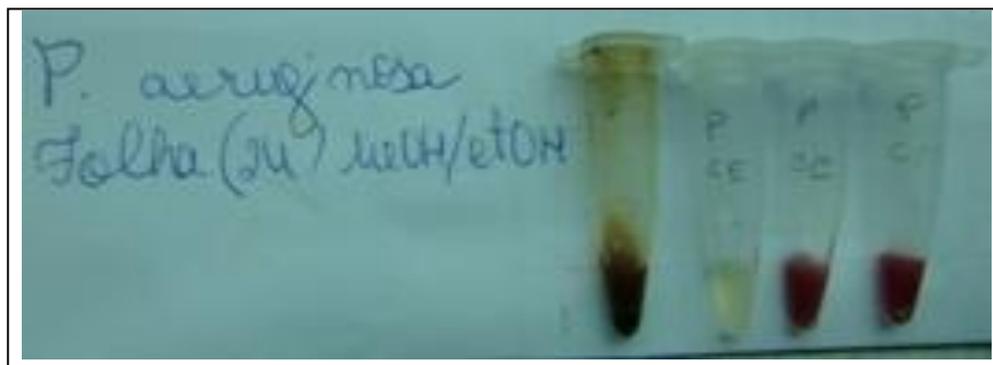


Figura 14 - Eppendorf: MIC da folha MeOH/EtOH frente a *P. aeruginosa*.

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

Não existe consenso sobre o nível aceitável de concentrações para extratos de plantas quando comparados com antibióticos padrões, portanto estes resultados de atividade antimicrobiana nas concentrações de 20 mg/mL para *P. aeruginosa* e 10 mg/mL para *S. aureus* são corroborativos nas alternativas antibióticas; diante do metabolismo e reprodução acelerados das bactérias associado ao mecanismo de troca de material genético que lhe permitem, ao longo do tempo, que desenvolvam formas de resistência intrínsecas à estrutura física celular e mutações.¹⁵⁹

Atividades antimicrobianas a partir de plantas para estes patógenos também foi buscada na *Peperomia pellucida* (erva-de-jabuti) e na *Portulaca pilosa* (amor-crescido), que apresentaram inibição nas concentrações de 500 a 62,5 µg/mL¹⁶⁰ e no extrato de *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae) obtiveram para *S. aureus* CIM superior a 400 µg/mL.¹⁴⁸

A necessidade de alternativas para estes patógenos incentiva inovações como estudos que mostraram compostos alcalóides em combinação com os antibióticos convencionais (metecilina, ampicilina) possuem efeitos antimicrobianos e o berberine contra o biofilme do gênero *Candida*.¹⁶¹⁻²

Nesta perspectiva, os extratos etanólico do pecíolo e etanólico/metanólico (2:1) da folha do *Cocos nucifera* Linn. possuem atividade antibacteriana que pode ser utilizado no tratamento de infecções.

4.4 Resultados dos testes de citotoxicidade

Toxicidade é um fator que limita a liberação e consumo de fármacos, portanto, sua análise associada à atividade biológica de compostos é fundamental para determinar a aplicação e estabelecer o índice terapêutico.⁴²⁻³

Foram realizados ensaios para identificar a viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774 pelo método MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolio].⁴⁴

Método colorimétrico rápido estabelecido para determinar o número de células viáveis baseado no teste de atividade das células pela redução do MTT.

A redução do MTT se dá pela clivagem do sal de tetrazólio-MTT (amarelo), para formar o formazan (violeta), pela ação da enzima succinato desidrogenase presente nas células ativas (Figura15). A quantidade de formazan é diretamente proporcional ao número de células vivas. Assim, quanto mais escura a coloração, maior é a viabilidade celular, cuja densidade óptica é identificada em espectrofotômetro.

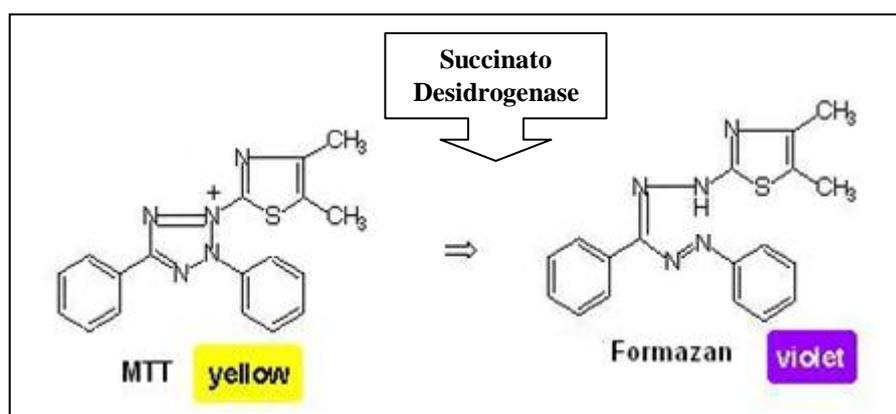


Figura 15 - Redução do sal de tetrazólio (MTT) em cristais de formazan

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

Na Figura 16 pode-se observar os resultados do ensaio de citotoxicidade nas concentrações de 1000, 200 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pois os controles negativo(meio) e lise controle positivo(lise) apresentaram excelência. O controle negativo (DMSO 2%) utilizado na solubilização dos extratos na concentração de 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ causou lise celular ($p < 0,01$), portanto os experimentos CNL1, 2, 3 e 4 a 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ficaram inviabilizados.

Foram testados os extratos da folha extraído em etanol/metanol (2:1) e extratos etanólicos das folhas (lâmina), pecíolo e caule do *C. nucifera* L.; nas concentrações de 1000, 200 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, correlacionados aos controles negativos DMSO a 1%, 0,2% e 0,1% respectivamente.

Nas concentrações de 200 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, os extratos etanólicos da folha-lâmina (CNL1), pecíolo (CNL3), caule (CNL4) e folha etanólica/metanólica (CNL2) não apresentaram citotoxicidade estatisticamente significantes em macrófagos da linhagem J774 ($p > 0,05$).

Nos testes na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, o extrato etanólico do pecíolo não apresentou citotoxicidade, enquanto as lâminas das folhas ($p < 0,001$) e caule ($p < 0,01$) apresentaram-se tóxicas nesta concentração.

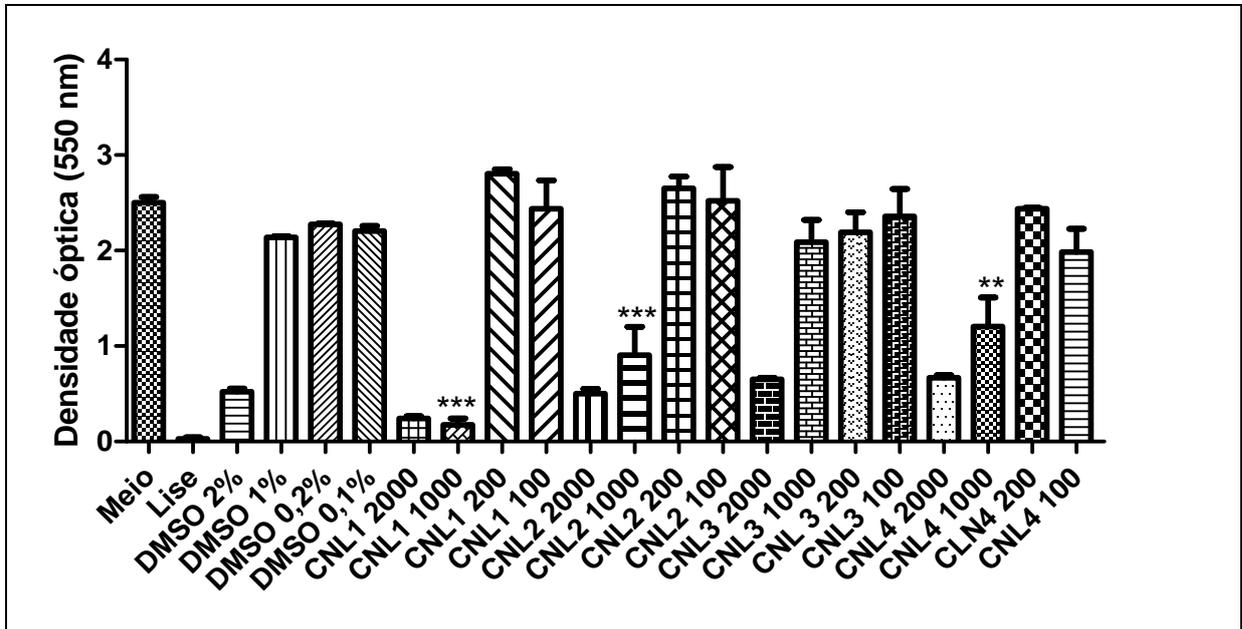


Figura 16 - Atuação dos extratos do *C. nucifera* L. (CNL) nas concentrações de 2000, 1000, 200 e 100 $\mu\text{g/mL}$ em macrófagos da linhagem J774.

Os dados representam a média e o erro padrão da média. **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$).

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

Os extratos das folhas e caule do *Cocos nucifera* Linn não apresentaram citotoxicidade nas concentrações de 200 e 100 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o extrato etanólico do pecíolo foi atóxico à partir de 1000 $\mu\text{g/mL}$. (Figura 17).

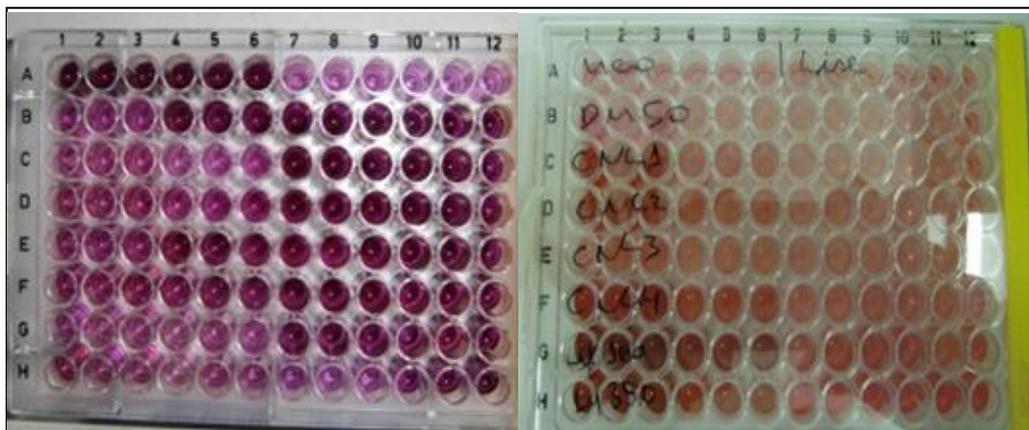


Figura 17 - Atoxicidade dos extratos do *C. nucifera* L. a 200 $\mu\text{g/mL}$ (colunas 7, 8 e 9) e 100 $\mu\text{g/mL}$ (colunas 10, 11 e 12). Caule - CNL3 (E) atóxico a partir de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (colunas 4, 5, 6) e pecíolo a 1000 $\mu\text{g/mL}$ citotóxico - CNL4 (F).

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

4.5 Resultados da avaliação da capacidade sequestradora de radicais livres

Os compostos fenólicos encontrados nas plantas são conhecidos por possuírem atividade antioxidante, principalmente devido as suas propriedades redutoras e estrutura química.¹⁵¹⁻¹⁵² Todos os extratos do *Cocos nucifera* Linn foram testados em triplicata quanto o potencial antioxidante, pela capacidade de sequestrar radicais livres frente ao DPPH, por meio dos ensaios qualitativos e quantitativos.

4.5.1 Avaliação qualitativa da capacidade sequestradora de radicais livres:

Os extratos foram expostos a 30 mL no sistema eluente de solventes, primeiramente em Hexano, entretanto não apresentaram eluição. Na sequência, Hexano/Acetato nas proporções 9:1; 8:2; 7:3 e 6:4 e demais solventes até eluição (Tabela7).

Tabela 7 - Sistema de eluição dos extratos do *C. nucifera* L. frente aos solventes: Hexano, Hexano/Acetato, Clorofórmio, Clorofórmio/Metanol. Maceió-AL, 2012.

Parte do <i>Cocos</i> <i>nucifera</i> Linn.	Extratos	Sequência de exposição dos solventes para eluição dos extratos			
		C₆H₁₂	C₆H₁₂/ AcOEt	CHCl₃	CHCl₃/ MeOH
Caule	EtOH	30 mL*	9:1*/8:2*/7:3*/6:4*	30 mL*	9:1
Pecíolo	EtOH	30 mL*	9:1*/8:2*/7:3*/6:4*	30 mL*	9:1
Folha	EtOH	30 mL*	9:1*/8:2*/7:3*/ 6:4		
Folha	EtOH/MeOH	30 mL*	6:4		

*Sem eluição.

Fonte: Autora da pesquisa, dez. 2012.

Na Cromatografia de camada delgada (CCD), a fase estacionária é constituída por uma fina camada de um sólido finamente dividido (adsorvente: sílica gel) que reveste a placa de vidro ou alumínio; de modo que o processo de separação ocorre em superfície plana, essencialmente bidimensional. Ao conjunto denomina-se Placa de cromatografia.¹⁶⁶

De forma resumida, uma gota da solução da amostra (soluto) é colocada a cerca de 1 cm da base da placa. Após evaporação do solvente, a placa é colocada em contato com a fase móvel em cuba cromatográfica. Desenvolve-se com a fase móvel migrando através da fase estacionária por ação da capilaridade; a este processo chama-se corrida. Como a amostra

interage com a fase móvel e a fase estacionária, na medida em que o solvente vai ascendendo na placa a amostra vai sendo “arrastada” pelo solvente.¹⁶⁶

Os extratos das folhas eluíram no Hexano/Acetato na proporção 6:4, portanto estas placas cromatográficas foram reveladas em lâmpada ultravioleta nos comprimentos de ondas de 254 e 365 nm, em seguida foi realizado o ensaio na placa de sílica gel em alumínio e revelado no iodeto de potássio por 10 segundos (Figuras 18 e 19).

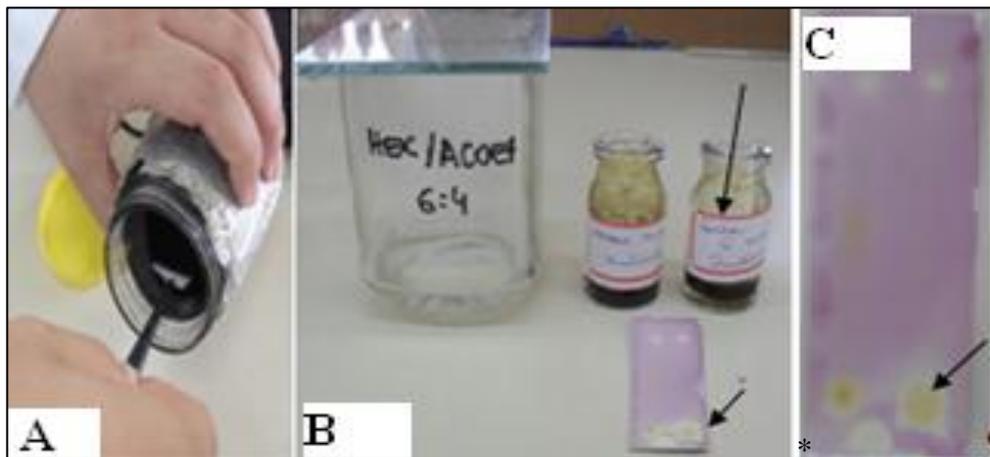


Figura 18 - Extrato folha EtOH do *C. nucifera* L. Revelação em iodo (A). Eluição em Hexano/Acetato(B). Placa de cromatografia.(C). Controle catequina (*).

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

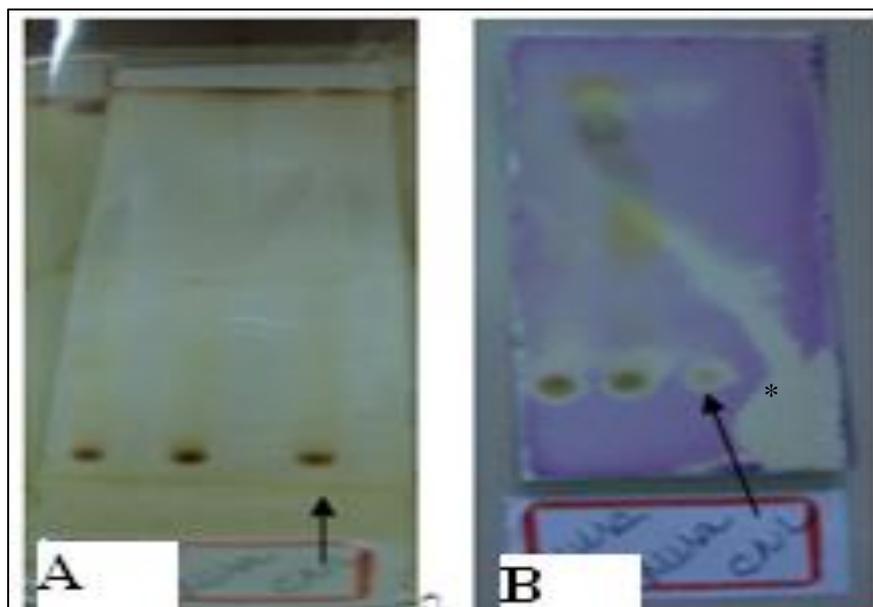


Figura 19 - Cromatografia em camada delgada. Folha EtOH/MeOH (CNL). Eluição Hexano/Acetato (A). Controle catequina (*B).

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

Observa-se que os extratos brutos etanólicos (Figura 18) e etanólico/metanólico (Figura 19) das folhas do *C. nucifera* Linn apresentaram atividade quanto à capacidade sequestradora de radicais livres frente ao DPPH no ensaio qualitativo. Visível pela coloração amarelada e esbranquiçada que se pode observar na placa de cromatográfica e comparada ao controle padrão catequina que se encontra na margem inferior.

Há então placas de sílica impregnadas com material fluorescente revelando-se suas manchas com lâmpada de UV. Compostos não polares interagem através da força fraca de Van der Waals, isto é, tais moléculas se ligarão fortemente ao adsorvente, a menos que possuam elevado peso molecular. Quanto mais polar for a molécula mais fortemente ela estará ligada ao adsorvente.¹⁵³ Diante do exposto presume-se que os extratos brutos das folhas do *C. nucifera* Linn possuem compostos polares visto que na “corrida” cromatográfica de camada delgada, além de coloração similar ao controle positivo catequina, atingiu altura significativa e não apresentou rastros residuais (Figuras 18 e 19).

Os extratos do Caule e Pecíolo, visto que não apresentaram eluição em Hexano ou soluções de Hexano/Acetato (9:1/8:2/7:3 e 6:4) e nem em Clorofórmio, foram expostas a solução de Clorofórmio/Metanol (9:1). Neste último eluíram bem, portanto seguiram para revelação em iodo (Figura 18).

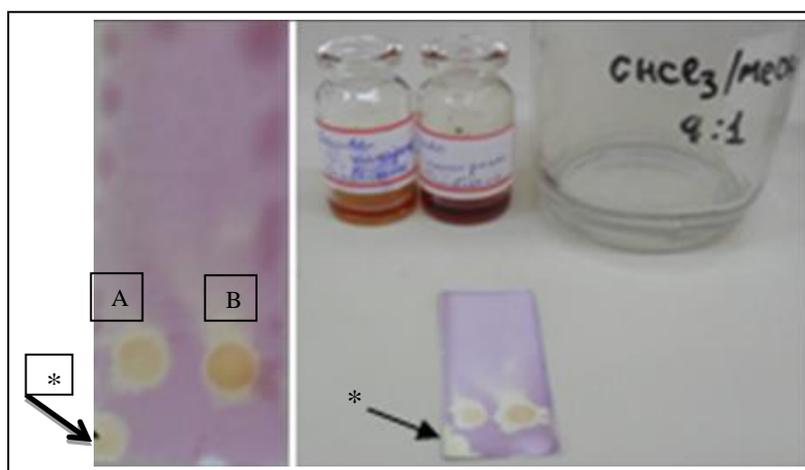


Figura 20 - Placa de cromatografia. Capacidade sequestradora de radicais livres. Caule (A) e Pecíolo (B). Controle: catequina (*).

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

Diante desses resultados pode-se inferir que todas as amostras do *C. nucifera* L. foram ativas (mancha amarela) no que se refere à capacidade sequestradora de radicais livres nos testes qualitativos comparados com o controle positivo catequina (*); o que indica

potencial ação antioxidante dos extratos. Portanto foram submetidas à avaliação quantitativa frente ao radical sintético DPPH, visando à confirmação das atividades (Figura 20).

4.5.2 Avaliação quantitativa da capacidade sequestradora de radicais livres

Baseado na capacidade do radical livre estável sintético DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) em reagir com substâncias doadoras de H (DPPH^{*} + [AH]_n ® DPPH-H + [A]_n) inclusive compostos fenólicos presentes em extratos vegetais. Mede a capacidade de substâncias potencialmente antioxidante de seqüestrar o radical livre DPPH^{*}.^{36,140,163}

Nestes ensaios os valores da CI₅₀ são inversamente relacionados à atividade e esta aumenta com a diminuição do DPPH remanescente no meio reacional. A absorbância foi revelada em espectrofotômetro UV-VIS (UV mini-1240 mod. Shimadzu). Nestes ensaios, quando o radical é seqüestrado a solução sofre descoloração. Quanto maior for o potencial antioxidante, mais descorada ficará, e conseqüentemente haverá menor absorção em 517 nm (Figuras 21 e 22). Foi adicionada à solução do reagente DPPH^{*} uma solução do extrato do *C. nucifera* L em MeOH nas concentrações de 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL (Figura 23).^{36,165-6}



Figura 21 - Espectrofotômetro e calibração da absorbância.

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

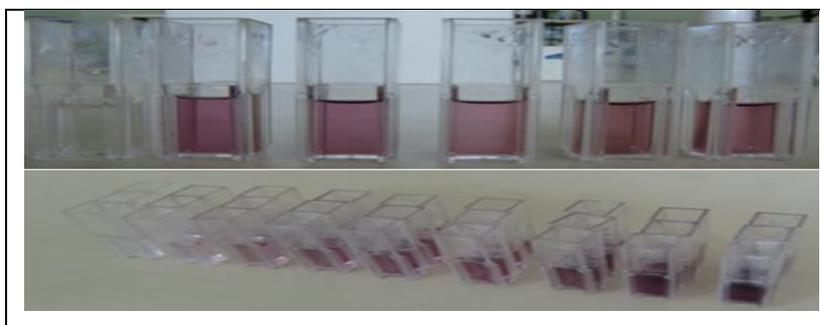


Figura 22 - Cubetas com extrato do *C. nucifera* L. e DPPH.

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.



Figura 23 - Soluções metanólicas dos extratos.
Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

Substâncias antioxidantes presentes em extratos doam um radical hidrogênio à estrutura do DPPH^{*}, reduzindo-a e formando difenil-picril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção. A atividade é avaliada pelo monitoramento do decréscimo da absorvância, sendo esta proporcional à concentração de substâncias antioxidantes presentes na amostra. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CI₅₀ e maior a sua atividade antioxidante.^{165-6,36}

A Tabela 8 mostra as médias das triplicatas dos valores obtidos nas curvas de calibração do espectrofotômetro.

Tabela 8 - Curva de calibração dos testes quantitativos frente ao DPPH.

Concentrações (mg/mL)	Folhas em EtOH	Pecíolo e Caule	Folhas em MetOH/EtOH
40	0,907	1.511,66	1,706
35	0,799	1.252,33	1,472
30	0,666	1.028,00	1,211
25	0,666	0.929,33	0,899
20	0,423	0.742,66	0,695
15	0,336	0.475,00	0,546
10	0,302	0.288,66	0,540
05	0,125	0.118,66	0,288
01	0,034	0.014,33	0,142

Fonte: Autora da pesquisa, dez. 2012.

Os extratos brutos do *C. nucifera* L. (caule com CI_{50} $135,034 \pm 0,04$ $\mu\text{g/mL}$; folha etanólica com CI_{50} $179,222 \pm 2,1$ $\mu\text{g/mL}$, pecíolo etanólico e folha etanólica/metanólica (2:1) com CI_{50} $779,704 \pm 1,025$ $\mu\text{g/mL}$), quando comparadas com os padrões [ácido gálico (CI_{50} $20,53 \pm 1,34$ $\mu\text{g/mL}$) e BHT (CI_{50} $97,86 \pm 2,52$ $\mu\text{g/mL}$)], caule e folhas apresentaram potencial antioxidante. Os extratos etanólico do pecíolo e etanólico/metanólico (2:1) da folha apresentaram valores de CI_{50} superior a 200 $\mu\text{g/mL}$, assim, considerados inativos.¹⁴¹

As Tabelas 9, 10, 11 e 12 apresentam as médias de absorvâncias dos radicais livres pelos extratos brutos etanólicos das folhas, pecíolo e caule, e folhas etanólica/metanólica (2:1) do *C. nucifera* L. respectivamente, nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos nas concentrações de 200, 150, 100, 50 e 25 $\mu\text{g/L}$.

Tabela 9 - Absorvâncias do extrato etanólico da folha do *C. nucifera*. Maceió-AL, 2012.

Concentrações do extrato ($\mu\text{g/L}$)	Médias das absorvâncias nos tempos (minutos)				
	T ₀	T ₁₅	T ₃₀	T ₄₅	T ₆₀
200	0,707	0,437	0,423	0,420	0,430
150	0,732	0,522	0,535	0,531	0,541
100	0,710	0,579	0,616	0,628	0,644
50	0,685	0,674	0,723	0,741	0,767
25	0,779	0,748	0,807	0,831	0,864

Fonte: Autora da pesquisa, dez. 2012.

Tabela 10 - Absorvâncias do extrato do caule do *C. nucifera* L. Maceió-AL, 2012.

Concentrações do extrato ($\mu\text{g/L}$)	Médias das absorvâncias nos tempos (minutos)				
	T ₀	T ₁₅	T ₃₀	T ₄₅	T ₆₀
200	1.374	0,482	0,393	0,356	0,336
150	1.172	0,701	0,638	0,614	0,605
100	1.161	0,874	0,839	0,841	0,847
50	1.340	1,228	1.240	1.266	1,298
25	1.254	1,193	1.224	1.263	1,316

Fator de correlação para o caule= 0,99711.

Fonte: Autora da pesquisa, dez. 2012.

Significa que a atividade antioxidante é considerável visto que se apresenta com fator de correlação $> 0,98$.

Tabela 11 - Absorbâncias do extrato do pecíolo do *C. nucifera* L. Maceió-AL, 2012.

Concentrações do extrato (µg/L)	Médias das absorbâncias nos tempos (minutos)				
	T ₀	T ₁₅	T ₃₀	T ₄₅	T ₆₀
200	1.314	1.142	1.1135	1.172	1.193
150	1.309	1.210	1.224	1.256	1.268
100	1.278	1.214	1.218	1.259	1.305
50	1.273	1.233	1.288	1.321	1.343
25	1.337	1.305	1.372	1.410	1.349

Fonte: Autora da pesquisa, dez. 2012.

Tabela 12 - Absorbâncias do extrato da folha MetOH/EtOH do *C. nucifera* L.

Concentrações do extrato (µg/L)	Médias das absorbâncias nos tempos (minutos)				
	T ₀	T ₁₅	T ₃₀	T ₄₅	T ₆₀
200	1,420	1,296	1,305	1,340	1,325
150	1,386	1,211	1,211	1,207	1,183
100	1,473	1,238	1,239	1,231	1,198
50	1,490	1,400	1,419	1,426	1,413
25	1,519	1,412	1,437	1,441	1,435

Fonte: Autora da pesquisa, dez. 2012.

As percentagens de DPPH remanescente versus as concentrações dos extratos do *C. nucifera* Linn testadas, foram plotados pelo programa Microcal OriginPro 6.0 e estão apresentados nas Tabelas 13 a 16. Nestas, observa-se a quantidade de antiradical necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% (CI₅₀) obtida pelo modelo matemático $Y = A + B.X$, onde A= coeficiente linear da reta da curva de calibração e B= coeficiente angular, X= concentração de DPPH no T₆₀ e Y= constante de Absorbância = 50%.

Tabela 13 - Tratamento estatístico da capacidade sequestradora de radicais livres pelos extratos etanólicos das folhas do *C. nucifera* Linn. Maceió-AL, 2012.

Parâmetro da folha etanólica	Valor	Erro	
A	98,58899	1,84798	
B	- 0,27111	0,01503	
R	SD (desvio padrão)	N	P
- 0,99542	2,15142	5	3,71378

Fator de correlação = - **0,99542**,

Fonte: Autora da pesquisa, dez. 2012.

$$X = \frac{Y-A}{B} \quad X = 50 - 98,58899 / - 0,27111 \quad X = 179,222 \mu\text{g/L}$$

O extrato etanólico das folhas apresentou capacidade sequestradora do radical livre DPPH, conferido por apresentar concentração de DPPH remanescente inferior a 200 $\mu\text{g/L}$ no tempo 60 minutos; no entanto após aplicação da estatística observa-se $p > 0,05$ o que torna duvidoso o resultado e necessitando que o teste seja repetido.

Tabela 14 - Tratamento estatístico da incapacidade sequestradora de radicais livres pelo extrato etanólico do pecíolo do *C. nucifera* L. Maceió-AL, 2012.

Parâmetro pecíolo	Valor	Erro	
A	94,49776	0,88058	
B	- 0,05707	0,00716	
R	SD (desvio padrão)	N	P
- 0,9772	1,02518	5	0,00412

Fator de correlação = - **0,9772**

Fonte: Autora da pesquisa, dez. 2012.

$$X = \frac{50 - 94,49776}{- 0,05707} \quad X = 779,704$$

O extrato etanólico do pecíolo não apresentou capacidade sequestradora frente ao radical sintético livre DPPH tratado estatisticamente e média da triplica com $p < 0,005$.

Tabela 15 - Tratamento estatístico da capacidade de sequestradora de radicais livres pelo extrato etanólico do caule do *C. nucifera* L. Maceió-AL, 2012.

Parâmetro caule	Valor	Erro
A	102,37975	3,86949
B	- 0,3879	0,03146
R	SD (desvio padrão)	N
- 0,99027	4,50488	5

Fator de correlação = - **0,99027**.

Fonte: Autor da pesquisa, 2012.

$$X = \frac{50 - 102,37975}{- 0,3879} \quad X = 135,034 \mu\text{g/L}$$

O extrato etanólico do caule apresentou capacidade sequestradora de radicais livres com concentração de DPPH remanescente inferior a 200 $\mu\text{g/L}$ no tempo 60 minutos; com variância sem significância estatística visto que na média da triplica $p < 0,005$.

Tabela 16 - Tratamento estatístico da incapacidade de sequestradora de radicais livres pelo extrato etanólico da folha MetOH/EtOH do *C. nucifera* L. Maceió-AL, 2012.

Parâmetro	Valor	Erro
folha MetOH/EtOH		
A	0,05097	0,06193
B	0,0389	0,0026
R	SD (desvio padrão)	N
0,9847	0,09943	9

Fator de correlação = **0,9847**.

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

$$X = \frac{50 - 0,05097}{0,0389} \quad X = 1.284,036 \mu\text{g/L}$$

Estes resultados sugerem que os extratos brutos etanólicos da folha e caule do *C. nucifera* Linn possuem compostos químicos com alta capacidade sequestradora de radicais livres frente ao DPPH, pois apresentaram Concentração inibitória CI_{50} de **135,034** \pm 0,04 $\mu\text{g/mL}$ e **179,222** \pm 2,1 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, o que remete a atividade antioxidante.

O valor elevado apresentado pelos extratos brutos do pecíolo e folha metanólico/etanólico indicam que não apresentam capacidade sequestradora de radicais livres frente ao DPPH, portanto não demonstraram potencial antioxidante.

Todos os resultados foram tratados estatisticamente, plotados em gráfico da cinética de adsorção do radical livre DPPH (Figura 23) e comparados em gráfico com os padrões utilizados: BHT e ácido gálico. (Figura 24)

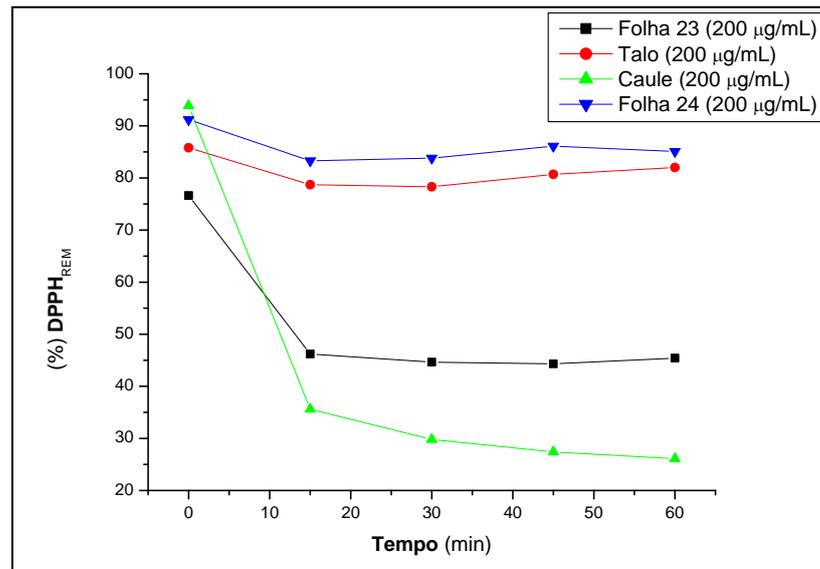


Figura 24 - Cinética do DPPH_{REM} aos extratos do *C. nucifera* L.

Fonte: Autora da pesquisa, 2012.

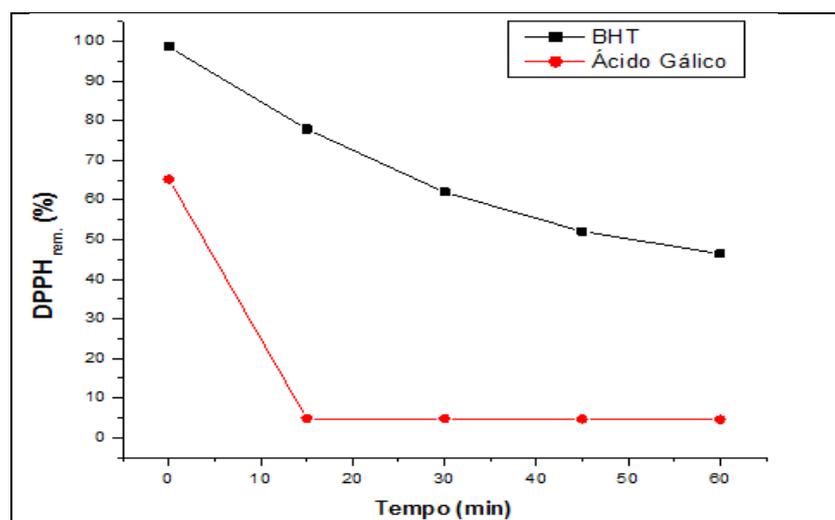


Figura 25 - Cinética do DPPH_{REM} aos controles padrões: ácido gálico e BHT.

Fonte: Autor da pesquisa, 2012.

Observa-se na figura 24, a cinética rápida dos extratos brutos do caule e folha etanólica do *C. nucifera* Linn, na redução do percentual do radical livre sintético DPPH, de 95% para 35% nos primeiros 15 minutos e continuando em redução pelo extrato do caule, e redução de 77% para 45% pela folha, mantendo-se até o tempo de 60 minutos avaliados; resultados equivalentes ao padrão ácido gálico visualizável na figura 25.

Os extratos etanólico do pecíolo e etanólico/metanólico (2:1) das folhas não foram capazes de sequestrar o radical livre DPPH conforme figura 24, onde a %DPPH remanescente permanece quase inalterado ao longo dos 60 minutos, em comparação com o padrão BHT (figura 25) de cinética lenta mas que é capaz de reduzir a 50% os radicais livres até o tempo de 60 minutos.

Diante dos resultados obtidos, sugere-se a continuidade dos testes antioxidantes com o extrato etanólico da casca do caule do *C. nucifera* L. e repetição do teste quantitativo da capacidade sequestradora de radicais livres do extrato etanólico da folha a fim de obter análise de variância da média da triplicata, ao tratamento estatístico, não significativo ($p < 0,05$).

Os resultados desta pesquisa indicam atividade antimicrobiana, potencial antioxidante por apresentar capacidade sequestradora de radicais livres e ausência de citotoxicidade em alguns dos extratos brutos da espécie vegetal *Cocos nucifera* Linn. Corroborativo para o estabelecimento da Enfermagem na produção do conhecimento científico na pesquisa básica e para inovação tecnológica no setor saúde. O estudo permitiu relacionar as seguintes conclusões:

1. Os rendimentos dos quatro extratos foram satisfatórios, viabilizando o uso do extrato vegetal de forma sustentável. A melhor obtenção após rotaevaporação foi de 28% pela extração etanólica/metanólica (2:1) das folhas (lâmina).
2. Todos os extratos apresentaram capacidade sequestradora de radicais livres nos ensaios qualitativos.
3. Os extratos etanólicos do caule ($CI_{50} = 135,034 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$) e folha ($CI_{50} = 179,222 \pm 2,1 \mu\text{g/mL}$) do *Cocos nucifera* Linn apresentaram capacidade sequestradora de radicais livres nos ensaios quantitativos espectrométricos, frente ao radical sintético DPPH, o que confere-lhes potencial antioxidante.
4. Os extratos etanólico do pecíolo e etanólica/metanólica (2:1) da folha ($CI_{50} = 779,704 \pm 1,025 \mu\text{g/mL}$ e $CI_{50} = 1.284,036 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$ respectivamente) apresentaram valores de CI_{50} superior a 200 $\mu\text{g/mL}$, portanto, não apresentaram capacidade sequestradora de radicais livres no ensaio quantitativo frente ao DPPH.
5. Quanto aos experimentos antimicrobianos, os extratos brutos etanólicos do pecíolo e etanólico/metanólico (2:1) da folha (lâmina) do *Cocos nucifera* Linn inibiram o crescimento bacteriano de *S aureus* e *P aeruginosa*; nos ensaios de difusão em placas de Ágar.
6. A menor concentração inibitória do crescimento do *S aureus* pelos extratos brutos da folha etanólico/metanólico (2:1) e o extrato etanólico do pecíolo do *Cocos nucifera* Linn foi de 10mg (5%).
7. A menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano da Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* foi de 20mg (10%); apresentado pelos extratos brutos da folha etanólico/metanólico (2:1) e o extrato etanólico do pecíolo do *Cocos nucifera* Linn.
8. O extrato do caule a 10% não inibiu o crescimento bacteriano de *S aureus*, *P aeruginosa* ou *E coli*.
9. Nenhum dos extratos a 10% apresentou atividade para *E coli* e nem antifúngica frente a *C. albicans* na concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC.

10. Os extratos brutos do *C. nucifera* Linn não apresentaram citotoxicidade nas concentrações de 200 e 100 µg/ml frente às células da linhagem J774.
11. O extrato bruto etanólico do pecíolo do *Cocos nucifera* Linn não causou citotoxicidade celular significativa estatisticamente ($p < 0,05$), na concentração de 1000 µg/mL; enquanto as folhas e caule apresentaram-se tóxicas nesta concentração ($p < 0,001$).
12. Os ensaios de citotoxicidade com 2000µg foram inviabilizados por atividade citotóxica do solvente DMSO à 2%.

As atividades antibacterianas apresentadas reforçam a viabilidade da continuação dos ensaios antimicrobianos com estas partes ativas, lâmina e pecíolo das folhas da espécie vegetal *C. nucifera* Linn, ultrapassando o proposto neste estudo, visto que foram ativas tanto para bactérias Gram positiva como para Gram negativa, sugere-se a realização de screen antibacteriano.

Esta pesquisa contribui para a ampliação do conhecimento do potencial terapêutico e biológico da espécie vegetal *C. nucifera* Linn coletado em solo alagoano, no que se refere a: 1) identificação de atividade antimicrobiana frente à Gram positiva *S aureus* e Gram negativa *P. aeruginosa* encontrada nas folhas - lâmina e pecíolo; 2) sua capacidade sequestradora de radicais livres observada nas folhas (lâmina) e caule; 3) ausência de citotoxicidade no pecíolo do *Cocos nucifera* Linn na concentração de 1000 µg/mL; e nas folhas (lâmina) e caule em 200 e 100 µg/mL.

Os achados desta pesquisa remetem à necessidade de associação com outros extratos de plantas ou drogas que possuam atividade antimicrobiana para Gram positivas e Gram negativas a fim de potencializar as atividades encontradas na folha (lâmina) e pecíolo do *C. nucifera* Linn. frente à *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Quanto à capacidade sequestradora de radicais livres, sugere-se a continuidade de testes com os extratos etanólicos da casca do caule e folha do *C. nucifera* L. para refinar a atividade antioxidante. No que se refere a segurança de seu uso em humanos, recomenda-se a partir dos resultados deste estudo frente a células do tipo J774, a utilização dos extratos brutos etanólicos do pecíolo na concentração a partir de 1000 µg/mL e da folha (lâmina) e caule à partir de 200 µg/mL; e outros testes com menores concentrações do solvente (DMSO 2%) a fim de identificar se existe toxicidade do extrato bruto etanólico do pecíolo do *C. nucifera* L. a em concentrações superiores a 1000 µg/mL.

As implicações para a prática da Enfermagem dos resultados deste estudo são, principalmente, a possibilidade de alternativas antimicrobianas e antioxidantes para o cuidado de Enfermagem com autonomia e ampliação dos campos de atuação do enfermeiro.

1. Hentz SM, Santin NC. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella* sp. Evidência 2007;7(2):93-100. Available from: <http://editora.unoesc.edu.br/index.php/evidencia/article/view/1863>
2. Silva MSA, Silva MAR, Higino JS, Pereira MSV, Carvalho AAT. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn sobre bactérias orais planctônicas. Rev Bras Farmacogn, João Pessoa. 2008 apr;18(2): 236-240. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v18n2/17.pdf>
3. Brasil. Ministério da Saúde. Divulga a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sus. Portaria n.971, 3 maio 2006. GM: Diário Oficial da União. 2006 may: 20. Available from: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf>
4. Duarte MCT. Atividade Antimicrobiana de plantas com propriedades terapêuticas e aromáticas utilizadas no Brasil: construindo a história dos produtos naturais. MultiCiência 2006;7:1-16. [access 2012 Mar 25]; Available from: http://www.multiciencia.unicamp.br/intro_07.htm
5. Cunha PLR, Paula RCM, Feitosa JPA. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: Uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Quím. Nova* [online]. 2009;32(3):649-60. [access 2013 Jan12], pp. 649-60. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300009&lng=en&nrm=iso. ISSN 0100-4042.<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000300009>.
6. Silva RL, Melo GB, Antonioli AR, Lima SO, Melo VA, Ramalho FS, et al. Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial. Acta Cir Bras. 2002;17 (3suplemento):101-5. [online]. [access 2012 Dec 12]. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/acb/v17s3/15275.pdf>
7. Brasil. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sus - RENISUS. [Acess 10 dec 2012]. Available from: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>.
8. Bresolin TMB, Cechinel Filho V. Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí, SC: Univali;2003.10-56p.
9. Santos JM dos, Campesatto EA, Bastos MLA, Santos RM dos, Lúcio IML, Conserva LM. Evaluation of biological activity of *Musa* spp(banana): integrative literature review. Journal of Nursing UFPE on line [JNUOL / DOI: 10.5205/01012007]. 2012 Aug;6(8):1948-57. Available from: <http://www.revista.ufpe.br/revistaenfermagem/index.php/revista/article/viewArticle/3020>

10. Nightgale F. Notas sobre Enfermagem: o que é e o que não é. Ribeirão Preto(SP): Cortez/ABEn-CEPEn; 1989:86. Available from: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=625803&indexSearch=ID>
11. Louzeiro JR. Ana Neri: A brasileira que venceu a guerra. Rio de Janeiro: Mondrian/Comunicação: 2002.
12. Borges EL, Saar SRC, Lima VLAN, Gomes FSL, Magalhães MBB. Feridas: como tratar. Belo Horizonte: Coopmed; 2001.
13. Olsen DL; Raub W; Bradley C; Johnson M; Macias JL; Love V; Markoe A. The effect of aloe vera gel/mild soap versus mild soap alone in preventing skin reactions in patients undergoing radiation therapy. *Oncol Nurs Forum*. 2001 Apr; 28(3): 543-7. Available from: <http://pesquisa.bvs.br/brasil/resources/mdl-11338761>
14. Bastos MLA, Lima MRF, Conserva LM, Andrade VS, Rocha EMM, Lemos RPL. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2009; 8-16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2691395/>
15. Asif A, Kakub G, Mehmood S, Khunum R, Gulfranz M. Wound Healing Activity of Root Extracts of *Berberis lyceum* royle in rats. *Phytother res*. [online]. 2007 [cited 2012 Mar 10];21(6):589–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17295382>
16. Lusby PE, Coombes AL, Wilkinson JM. A Comparison of Wound Healing following Treatment with *Lavandula x allardii* Honey or essential oil. *Phytother res*. [online]. 2006 [access 2012 Apr 3];20(9):755–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16807876>
17. Lino PB, Corrêa CF, Archondo MEDL, Dellova DCAL. Evaluation of post-surgical healing in rats using a topical preparation based on extract of *Musa sapientum* epicarp. *Rev bras farmacogn*. [online]. 2011 [access 2012 Mar 08];21(3):491-96. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-
18. Bastos MLA, Lúcio IML. Núcleo de Pesquisa e Inovação Tecnológica em Tratamento de Feridas. Ufal: 2011. [homepage na internet] Diretórios de grupos de pesquisa no Brasil. Available from: <http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/>

19. Silva MJP da, Leão ER. Estudo das práticas alternativas ou complementares de saúde. USP: 1989. [homepage na internet] Diretórios de grupos de pesquisa no Brasil. Available from: <http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/>
20. Ribeiro SAB, Barcelos ISC. Multidisciplinaridade e Saúde. UFG: 2009. [homepage na internet] Diretórios de grupos de pesquisa no Brasil. Available from: <http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/>
21. Santos RX, Melo SCO. Saúde Coletiva e estudo de Plantas Medicinais. FTC: 2010. [homepage na internet] Diretórios de grupos de pesquisa no Brasil. Available from: <http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/>
22. Araújo EC, Vasconcelos EMR. Saúde Coletiva e Práticas Integrativas e Complementares em Saúde. UFPE; 2002. [homepage na internet] Diretórios de grupos de pesquisa no Brasil. Available from: <http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/>
23. Diretórios de grupos de pesquisa no Brasil. Available from: <http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/>
24. Renaud BG, Oliveira B de. Grupo de Pesquisa em Feridas, Biomateriais e Pesquisa Clínica. UFF: 2010. [homepage na internet] Diretórios de grupos de pesquisa no Brasil. Available from: <http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/>
25. Guerra OG, Ferreira AM. Genética Molecular de Micro-organismos e Vegetal/ Biotecnologia (GMMV/Biotec) UFMS: 2006. [homepage na internet] Diretórios de grupos de pesquisa no Brasil. Available from: <http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/>
26. Caldas AJM, Aquino DMC de. Epidemiologia das doenças transmissíveis. UFMA: 2005. [homepage na internet] Diretórios de grupos de pesquisa no Brasil. Available from: <http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/>
27. Hora EC, Nunes MS. Estudos em Trauma: cuidados na prevenção, tratamento e reabilitação (Cuidatrauma) – UFS: 2012. [homepage na internet] Diretórios de grupos de pesquisa no Brasil. Available from: <http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/>
28. AM Ferreira, MCFS Candido. Grupo de pesquisa, ensino e extensão: Conhecimentos, práticas e legislação em direito e saúde. UFMS: 2009. [homepage na internet]. Diretórios de grupos de pesquisa no Brasil. Available from: <http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/>
29. Silva RCL, Figueiredo NMA, Meireles IB. Feridas: fundamentos e atualizações em Enfermagem. 2ªed. S. Paulo: Yendis; 2007.

30. Migliato KF, Moreira RRD, Mello JCP, Sacramento LVS, Correa MA, Salgado HRN. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Rev Bras Farmacogn. 2007;17(1):94-101. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n1/a18v17n1.pdf>
31. Alves LMM, Nogueira MS, Godoy S, Cárnio EC. Pesquisa básica na Enfermagem. Rev Latino-am Enfermagem. 2004 fev; 12(1):122-7. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rlae/v12n1/v12n1a17.pdf>
32. Koerich MHAL, Vieira RHG, Silva DE; Erdmann AL, Meirelles BHS. Produção tecnológica Brasileira na área de enfermagem: avanços e desafios. Rev. Gaúcha Enferm. vol.32n.4Porto AlegreDec.2011. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1983-14472011000400014&script=sci_arttext
33. Reis PED, Carvalho EC, Bueno PCP, Bastos JK. Clinical application of *Chamomilla recutita* in phlebitis: dose response curve study. Rev. Latino-Am. Enfermagem [online]. jan-feb 2011 [access 10 dec 2012];19(1): Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-11692011000100002
34. Anders PS, Tipple AFV, Pimenta FC. Kits para aerossol em um serviço de saúde: uma análise microbiológica após reprocessamento. Rev esc enferm USP, São Paulo,42(2)Jun 2008. [access 27 Nov 2012]. Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0080-62342008000200010&lng=en&nrm=iso.
35. Bond EF, Heitkemper MM. Physiological nursing science: emerging directions. Res Nurs Health 2001 Oct;24(5):345- 8. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/nur.1035/abstract;jsessionid=C73D4AC8739CDB9570F280BB37F456A4.d04t04>
36. Yesilyurt V, Halfon B, Öztürk MTG. Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*. Food Chemistry. 2008;108:31-9.
37. Ogava SEN, Pinto MTC, Kikuchi T, Meneguetti VAF, Martins DBC, Coelho SAD. et al. Implantação do programa de fitoterapia "Verde Vida" na secretaria de saúde de Maringá (2000-3). Rev. bras. farmacogn. [online]. [access 2012 Dec 09]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2003000300022>.
38. Conselho Federal de Enfermagem. Resolução COFEN 197/1997 [access 2009 sep 23]. Available from: <http://www.portalcofen.gov.br/2007/materias>.
39. Haida KS, Parzianello L, Werner s, Garcia DR, Inácio CV. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. Arq. Ciênc. Saúde

- Unipar, Umuarama. 2007sep; 11(3):185-192. Available from:
<http://revistas.unipar.br/saude/article/viewFile/2037/1779>
40. Hussain RF, Nouri AM, Oliver RT. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J Immunol. Method.* 1993;160(1):89-96
 41. Vieira, FT. Esquema de redução do Cloreto 2,3,5 Trifenil Tetrazolium (TCC). In: Compostos organoestânicos com ação farmacológica. 2008. Available from:
http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/SFSA-85YS6F/tese_fabiana_tavares_vieira.pdf
 42. Hayes AW. Principles and methods of toxicology. 5^a ed. Oxford: CRC Press, 2007.
 43. Degrave W, Jou S, Pereira LT, Emerick C. POP do Uso do Livro de Registro (Livro Verde - Experimentação) VPPDT– 0101-001. Vice-Presidência de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico. Rev 2 (access 2007 jul 13).
 44. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>
 45. Koerich MHAL, Vieira RHG, Silva DE, Erdmann AL, Meirelles BHS. Produção tecnológica brasileira na área de Enfermagem: avanços e desafio. *Rev Gaúcha Enferm.* 2011; 32(4):736-43. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1983-14472011000400014&script=sci_arttext
 46. Teixeira LM, Santos KRN, Bueris V, Trabulsi LR. *Staphylococcus aureus*. In: Trabulsi, LR, Alterthum F. (Org). *Microbiologia*. 5^aed. São Paulo: Atheneu; 2008.175-182.
 47. Konaté K, Mavoungou JF, Lepengué AN, Aworet-Samseny RRR, Hilou A, Souza A, et al. Producing Methicillin and Ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2012, 11:18 Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3464800/pdf/1476-0711-11-18.pdf>.
 48. Gomes AR, West H, Lencastre H. Antibacterial activity against β - lactamase: Origins and Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Lineages. 2006 Oct;50(10):3237-44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17005800>
 49. Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* J. *Med. Microbiol.* 2002; 292:67-74. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422104700867>

50. Finch RG, Eliopoulos GMJ. Safety and efficacy of glycopeptide antibiotics. *J Antimicrob. Chemother.* 2005; 55 (Suppl 2):5-13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15750036>
51. Appelbaum PC. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Mar; 12 (Suppl 1):16-23. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2006.01344.x/full>
52. Finch R, Hunter PA. J. Antibiotic resistance-action to promote new technologies: report of an EU Intergovernmental Conference held in Birmingham. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Sep;58 (Suppl 1):i3-i22. [access Epub 2006 Sep 26]. Available from: http://jac.oxfordjournals.org/content/58/suppl_1/i3
53. Jones RN, Castanheira M, Mendes RE, Rhomberg PR. Rapid emergence of blaCTX-M among enterobacteriaceae in U.S: molecular evaluation from the MYSTIC Program. *Medical Centers.* 2007 Sep;14(3):211-6. doi: 10.1089/mdr.2008.0827. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008, 14, 3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18707552>
54. Palmeira JD, Ferreira SB, Holanda JS, Almeida JM de, Figueiredo MC, Pequeno AS, et al. Evaluation of the antimicrobial activity *in vitro* and determination of minimum the inhibitory concentration(MIC) of hidroalcoholic extracts of angico in strains *Staphylococcus aureus*. *RBAC* 2010;42(1):33-7, Available from: http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_42_01/rbac_42_01_07.pdf
55. Lincopan N, Trabulsi LR. *P aeruginosa*. In: Trabulsi, L R; Alterthum, F, (Org.). *Microbiologia*. 5ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2008;369-381.
56. Dias MT, Bricio SML, Almeida DO, Oliveira LAT, Filippis I de; Marin VA. Molecular characterization and evaluation of antimicrobial susceptibility of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from minas soft cheese. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, Campinas, 2012. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612012000400017&script=sci_arttext
57. Chao-Dong Qian, Xue-Chang Wu, Yi Teng, Wen-Peng Zhao, Ou Li, Sheng-Guo Fang, Zhao-Hui Huang, Hai-Chun Gao. Battacin (Octapeptin B5): a new cyclic lipopeptide antibiotic from *paenibacillus tianmuensis* active against multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Mar;56(3):1458–65. doi: 10.1128/AAC.05580-11PMCID: PMC3294921. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3294921>

58. Salgado PS, Yan R, Taylor JD, Burchell LJ, Jone R, Hoyer LL et al. Structural basis for the broad specificity to host-cell ligands by the pathogenic fungus *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci USA. 2011 Sep 20;108(38):15775-15779. doi: 10.1073/pnas.1103496108 PMID: PMC3179088 Biochemistry. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3179088/?tool=pubmed>
59. Dealey C. Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
60. Dumville JC, Walter C J, Sharp CA, Page T. Dressings for the prevention of surgical site infection. Cochrane Database of Systematic Reviews. In: *The Cochrane Library*, Issue 11, Art. No. CD003091. DOI: 10.1002/14651858.CD003091.pub7. 2012. Available from: <http://cochrane.bvsalud.org/cochrane/main.php?lib=COC&searchExp=Dressings%20and%20for%20and%20the%20and%20prevention%20and%20of%20and%20surgical%20and%20site%20and%20infection&lang=pt>
61. Telles M. Tratamento ambulatorial: particularidades da assistência na rede pública de saúde. In: Silva L, Figueiredo NMA, Meireles IB. Feridas: fundamentos e atualizações em Enfermagem. São Caetano do Sul: Yendis; 2007.
62. Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA, Aronson-Cook B, Kohli AR, Mamelak AJ. Treating the chronic wound: a practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. J Am Acad Dermatol. 2008;58:185–206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18222318>
63. Price LB, Liu CM, Melendez JH, Frankel YM, Engelthaler D, Aziz M, et al. 2009. Community analysis of chronic wound bacteria using 16S rRNA gene-based pyrosequencing: impact of diabetes and antibiotics on chronic wound microbiota. PLoS One. 2009;4:e6462. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19649281>
64. Tuttle MS; Mostow E; Mukherjee P; Hu FZ; Melton-Kreft R; Ehrlich GD; Dowd SE; Ghannoum MA. Characterization of bacterial communities in venous insufficiency wounds by use of conventional culture and molecular diagnostic methods. J Clin Microbiol;49(11):3812-9, 2011 Nov. [MEDLINE PMID: 21880958] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21880958>
65. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. Antimicrob.

- Agents Chemother. 2004;48:2659–64. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215123>
66. Ehrlich GD, Ahmed A, Earl J, Hiller NL, Costerton JW, Stoodley P, Post JC, DeMeo P, Hu FZ. The distributed genome hypothesis as a rubric for understanding evolution in situ during chronic bacterial biofilm infectious processes. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2010; 59:269–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20618850>
 67. Hu FZ., Ehrlich GD. Population-level virulence factors amongst pathogenic bacteria: relation to infection outcome. *Future Microbiol.* 2008 Feb;3(1):31–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18230032>
 68. Sem CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK, et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen.* 2009;17:763–71. doi: [10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x](https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2810192/>
 69. Fan K, Tang J, Escandon J, Kirsner RTS. State of the Art in Topical Wound-Healing Products. *Plast. Reconstr. Surg.* 2011;127(44S).
 70. Lima ACB, Guerra DM. Avaliação do custo do tratamento de úlceras por pressão em pacientes hospitalizados usando curativos industrializados. *Ciênc. saúde coletiva.* 2011 Jan;16(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232011000100029>.
 71. Bueno VJM. Valorización del riesgo de aparición de úlceras de presión en la unidad de cuidados intensivos. *Rev Eletrônica de Medicina Intensiva* 2005;5(11):art.923 [online] Available from: <http://remi.uninet.edu/2005/11/REMI/0923.htm>
 72. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas. Brasília: Ministério da Saúde. 2002;56:54-8.
 73. Oliveira MJR, Simões MJS, Sassi CRR. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (Sus) no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev bras plantas med.* [online]. 2006 [access 2012 Mar 21];8(2):39-41. Available from: http://www.bioethicus.com.br/d_artigos/1182908606.pdf
 74. Pinhati, HMS, Moura, EB, Damasceno, CMG. Bactérias multirresistentes: enfoque sobre os gram-negativos hospitalares. *Brasília Med.*2010;47(4):460-4.
 75. Vale AT, Barroso RA, Quirino WF. Caracterização da biomassa e do carvão vegetal do coco-da-baía (*C. nucifera* L.) para uso energético. *Biomassa & energia.* 2004; 1(4):65-70.

76. Echevarria, J. El problema del *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina. Rev Med Hered, 2010;21(1):1-3. Available from:
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v21n1/v21n1e1.pdf>
77. Tavares W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop, Uberaba, Jun 2000;33(3). [Acess 2012 Dec 04]. Available from
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822000000300008&lng=en&nrm=iso>.
78. Duarte D, Veras MA, Martins JA. Perfil evolutivo da resistência do *Staphylococcus aureus*: experiência do Hospital Adventista Silvestre. In: Programa Oficial e Resumo de Trabalhos do VIII Congresso Brasileiro de Infectologia. 1994. Porto Alegre. Resumo nº 91, 82p.
79. Abraham EP, Chain E. A enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature. 1940;146:837p.
80. Bauer AW, Perry DM, Kirby WMM. Drug usage and antibiotic susceptibility of staphylococci. Journal of the American Medical Association. 1960;173:475-80.
81. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. British Journal of Experimental Pathology 1929;10:226-36. (reimp Review of Infectious Diseases 2:129-39, 1980)
82. Pinto CAG, Santi LQ, Santos AAM, et al. Comportamento microbiológico das infecções comunitárias no Hospital Municipal Odilon Behrens (HNOB) jan/94 a dez/95. In: Programa Científico Oficial do IX Congresso Brasileiro de Infectologia. 1996; Recife. Res 413:184 p.
83. Rangel E, Furtado A, Furtado W, Macedo J, Cunha Jr. AC, Macedo V, Moretto D. Avaliação das culturas de secreções do laboratório do Hospital Universitário de Brasília (HUB)-DF e do perfil de resistência aos antimicrobianos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1995;28(supl 1):263.
84. Duarte DA, Sá ALB. Resistance and sensibility of strains of the *staphylococcus aureus* the antibiotic β -lactams stranded of unity hospital. Systematic bibliographic revision of the lasts ten years. Reas, revista eletrônica acervo saúde. 2011;1:108-21. Available from
http://acervosaud.dominiotemporario.com/doc/artigo_010.pdf
85. Silva RCL, Figueiredo NMA, Meireles IB. Feridas: Fundamentos e atualizações em Enfermagem. 2ª ed. São Paulo: Yendis; 2007.

86. Nostro A, Germano MP, D'Ángelo V, Marino A, Cannatelli MA. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett. Applied Microbiol.* 2000;30:379-84. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10792667>
87. Rodrigues S; Pinto GA; Fernandes FA Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*C. nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrason Sonochem.* 2008 Jan;15(1):95-100. [access Epub 2007 Feb 3].
88. Di Carlo G; Mascolo N; Izzo AA; Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences.* 1999;65:337-53.
89. Venkataraman S, Ramanujam TR, Venkatasubbu VS. Antifungal activity of the alcoholic extract of coconut shell - *C. nucifera* Linn. *J Ethnopharmacol.* 1980 Sep;2(3):291-3. PMID:17400017[online]
90. Fontes HR, Wanderley M. Situação atual e perspectivas para a cultura do coqueiro no Brasil. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros; 2006.
91. Naskar S, Mazumder UK, Pramanik G, Bala A, Haldar PK, Islam A, et al. Comparative in vitro antioxidant activity of different parts of *C. nucifera* on reactive oxygen and nitrogen specie. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011;3(3):104-7.
92. Simões CMO, Schenkel E R, Gosmann G, Mell JCR, Mentz LA, Petrovick RR. Organizadores. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS; 2004.
93. Chan E, Elevitch CR. *C. nucifera* (coconut). *Agroforestry.*2006. Available from
<http://www.agroforestry.net/tti/Cocos-coconut.pdf>.
94. Gargi Dey, Moumita Chakraborty, Adinpunya Mitra. Profiling C₆-C₃ and C₆-C₁ phenolic metabolites in *Cocos nucifera*. *Journal of Plant Physiology.* 22 Apl 2005;162(4):375-81.
95. Mohamed S, Jafri J, Mustapha NM; Ahmad IN, Razak MA. inventor. Extract from palm leaves and a method for producing the same. United States 12/668311 . 2011 jun 01. Patent Application 20110003019. [access 2011 Jun26]Available from
<http://www.freepatentsonline.com/y2011/0003019.html>
96. Obi RK, Sivamohan RG, Maheswari UC. Structural characterization of coconut tree leaf sheath fiber reinforcement. *Res Vet Sci.* 2010 Feb;88(1):101-3. [access Epub 2009 Jun 7]. *Journal of Forestry Research.*2010;21(1):53-8 DOI 10.1007/s11676-010-0008-0.

97. Costa CTC, Bevilaqua CML, Morais SM, Camurça-Vasconcelos ALF, Maciel MV, Braga RR, et al. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. on intestinal nematodes of mice. *Res Vet Sci.* 2010;88(1):101-3.
98. Esquenazi D, Wigg MD, Miranda MMFS, Rodrigues HM, Tostes JBF, Rozental S. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Res Microbiol.* 2002; 153(10):647-52.
99. Dey G, Sachan A, Ghosh S, Mitra A. Detection of major phenolic acids from dried mesocarpic husk of mature coconut by thin layer chromatography. *Ind Crops Products* 2003;18:171-6.
100. Bankar GR, Nayak PG, Bansal P, Paul P, Pai KS, Singla RK, Bhat VG Vasorelaxant and antihypertensive effect of *Cocos nucifera* Linn. endocarp on isolated rat thoracic aorta and DOCA salt-induced hypertensive rats. *J Ethnopharmacol.* 2011 Mar 8;134(1):50-4. Epub 2010 Dec 1.
101. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Technol.* 1995;28:25-30.
102. Junqueira PC. Determinação do conteúdo orgânico mineral e avaliação do potencial antioxidante da Insulina Vegetal (*Cissus sicyoides*, L.). Dissertação. UFRRJ, Rio de Janeiro, 2010.
103. Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Jr. GM, Ayres MCC, Costa, CLS, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas com propriedades terapêuticas. *Quím. Nova.* 2007 jul;30(2):351-5p.
104. Silva DA, Silva TMS, Lins ACS, Costa DA, Cavalcante JMS, Matias WN, et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). *Quim. Nova.* 2006; 29(6):1250-4p.
105. Sousa CMM, Silva HR, Vieira-JR GM, Ayres MCC et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova.* 2007;30(2):351-5p
106. Morais SM, Cavalcanti ESB, Costa SMO, Aguiar LA. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Rev. bras. de farmacogn.* 2009;19(1):315-20.
107. Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2007;27(1):53-60.
108. Bailey AE. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 5ª ed;3. Wiley J. New York, 1996. In: Ramalho VC. *et al.* Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova.* 29(4). São Paulo, 2006.

109. Stanilova M, Gorgorov R, Trendafilova A, Nikolova M, Vitkova A. Influence of nutrient medium composition on in vitro growth, polyphenolic content and antioxidant activity of *Alchemilla mollis*. *Nat Prod Commun*. 2012;7(6):761-6.
110. Silva, R da. Estudo termoanalítico de ester de sorbitan etoxilado. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
111. Microcal Software. *OriginPro 7.0 Software*. USA: OriginLab Corporation, 1991-2002.
112. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 90, de 18 de março de 2004. Determina publicação do “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília (DF): Imprensa Oficial; mar 2004. Seção 1.
113. Melo PS, Maria SS, Vidal BC, Haun M, Durán N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Animal*. 2000;36:539
114. Renzi D, Valtolina M, Forster R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. *ATLA-Altern. Lab. Anim*. 1993;21:89-96
115. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. John Wiley & Sons Inc. NY, 2000
116. Azevedo MMM de. Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, consequências e perspectivas. Tese de doutorado. Instituto de Química – IQ. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, SP: [s.n], 2005. Available from: <http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/vtIs000374061.pdf>
117. Souza-Moreira TM, Salgado HRN, Pietro RCLR. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas com propriedades terapêuticas. *Rev bras farmacogn* 2010;20(3): 435-40.
118. Maciel MA, Pinto AC, Veiga jr VF, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas com propriedades terapêuticas: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova*. 2002; 25(3): 429-38p.
119. Franca ISX, Souza JA, Baptista RS, Britto VRS. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas com propriedades terapêuticas. *Rev. bras. enferm*. 2008; 61(2): 201-8.
120. Clinical and Laboratory Standards Institute/CLSI. *Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão*. 8ª ed. Pensilvânia/EUA: Wayne, 2005

121. Silva Filho CRM, Souza AG, Conceição MM, Silva TG, Silva TMS, Ribeiro APL. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. Rev bras farmacogn 2009; 19(4):919-23.
122. Ardisson L, Godoy JS, Ferreira LAM, Stehmann JR, Brandão MGL. Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.)Coville (Barbatimão). Rev bras Farmacogn 2002;12(1):27-34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2002000100004>.
123. Ayres MCC, Brandão MS, Vieira-Júnior GM, Menor JCAS, Silva HB, Soares MJS, et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. Rev Bras Farmacogn. 2008;18(4):90-7.
124. Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas com propriedades terapêuticas. Rev Bras farmacogn. 2008;18(2):301-07.
125. Karadi, RV; Arpan S; Parekh, P; Azmi, P. Antimicrobial Activities of *Musa paradisiaca* and *C. nucifera*. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 2011;2(1):264-7.
126. Schinor EC, Salvador MJ, Ito IY, Dias DA. Evaluation of the antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents from *Chresta scapigera*. Braz. J. Microbiol. 2007;38(1):145-9.
127. Paiva, S, Figueiredo MR, Aragao TV, Kaplan MAC. Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from *Plumbago* species. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2003;98(7):959-61.
128. Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2003.
129. Carvalho AAT, Sampaio MCC, Sampaio FC, Melo AFM, Sena KXFR, Chiappeta AA, et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram-negativas. Acta farm Bonaerense. 2002;21(4):255-8.
130. Chandrasekaran M, Venkatesalu V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jabolatum* seeds. J Ethnopharmacol. 2004; 91(1):105-8.
131. Caceres A, López B, González S, Berger I, Tada I, Maki J. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and

American trypanosomes of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*.

1998;62:195-202. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874198001408>

132. Saxena S, Gomber C. Comparative *in vitro* antimicrobial procedural efficacy for susceptibility of *S. aureus*, *E. coli* and *Pseudomonas* sp to chloramphenicol, ciprofloxacin and cefaclor. *Br J Biomed Sci*. 2008; 65(4):178-83.
133. Okeke MI, Iroegbu CU, Eze EN, Okoli AS, Esimone CO. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001;78:119–27.
134. Luangtongkum T, Morishita TY, El-Tayeb AB, Ison AJ, Zhang Q. Comparison of Antimicrobial Susceptibility Testing of *Campylobacter* spp. by the Agar Dilution and the Agar Disk Diffusion Methods. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(2):590–4.
135. Silva Junior IF, Cechinel Filho V, Zacchino SA, Lima JCS, Martins DTO. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. *Rev. Bras. farmacogn*. 2009;48(19):242-8.
136. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(9):4168-70.
137. Valadares MC, Cunha NCE, LC. *Synadenium Umbellatum*: Citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Rev. Bras. Cienc. Farm*. 2007;43(4) Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000400017&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
138. Lorge HM, Albertini S, Kirkland D. Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test I. Theoretical aspects. *Mutat Res*. 2008;665(1-2):1-3.
139. Stanilova M, Gorgorov R, Trendafilova A, Nikolova M, Vitkova A. Influence of nutrient medium composition on *in vitro* growth, polyphenolic content and antioxidant activity of *Alchemilla mollis*. *Nat Prod Commun*. 2012;7(6):761-6.
140. Soler-Rivas C, Espín JC, Wiches HJ. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*. 2000;11(5):330-8.
141. Otang WM, Grierson DS, Ndip RN. Phytochemical studies and antioxidant activity of two South African medicinal plants traditionally used for the management of

- opportunistic fungal infections in HIV/AIDS patients. BMC Complement Altern Med. 2012;13;12:43.
142. Pereira MC, Castilho PM, Vizzotto M. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante em frutas de cultivares e seleções de Amoreira-preta (*Rubus* sp.). In: Anais do XVII CIC e X ENPOS; 2008 Nov. 11-4; Pelotas(RS): Universidade Federal de Pelotas; 2008.
143. Kuskoski EM, Asuero AG, Morales MT, Fett R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. Cienc Rural. 2006;36(4):1283-7.
144. Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. Cienc Tecnol Aliment 2007; 27(1):53-60.
145. Tattini Jr. V, Parra DF, Pitombo RNM. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. Rev. Bras. Cienc. Farm. 2006;42(1):127-36.
146. Gregório G, Albano O, Marques LC, Ayala S, Carvalho J et al. J. H. Soyfemme a isoflavona contra o climatério. Phytociência. 2006;1(2):1-7.
147. Tomazzoni MI, Negrelle RRB, Centa ML. Fitoterapia Popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. Texto Contexto Enferm. 2006; 15(1):115-21.
148. Alves EG. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. Quím. Nova, São Paulo:2008;31(5) [access 08 Dec. 2012]. Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000500052&lng=en&nrm=iso.
149. Bastos MLA, Tenorio LMMC, Almeida, LCT, Lucio IML, Veríssimo RCSS. Potencial antimicrobiano do óleo de coco: uma contribuição da Enfermagem no tratamento de feridas. Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste. 2012;13: 693-703.
150. Bastos MLA, Houly RLS, Conserva LM, Andrade VS, Rocha EMM, Lemos RPL. Antimicrobial and wound healing activities of *Piper hayneanum*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2011;3:213-22. Available from: <http://jocpr.com/vol3-iss4-2011/JCPR-2011-3-4-213-222.pdf>
151. Tavares, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. São Paulo-SP: Ateneu; 2006. 583p.

152. Abu-Shanab B, et al. Antibacterial activities of some lant extracts utilized in popular medicine in Palestine. *Turkish Journal of Biology*. 2004;28:99-102.
153. Sivakumar MK, Moideen MM, Varghese R, Sheik B, Dhanapal CK. Preliminary phytochemical screening and antibacterial activity of *C. nucifera L.* root. *Res J Pharm Biol Sci*. 2011;2(4):468-77.
154. Deuschle RAN, Camargo T, Alves SH, Mallmann CA, Heizmann BM. Fracionamento do extrato diclorometânico de *Senecio desiderabilis* e avaliação da atividade antimicrobiana. *Rev Bras farmacogn*. 2007;17(2):220-3.
155. De Biasi B, Grazziotin NA, Hofmann Jr AE. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. 2009;19(2):582-5. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2009000400013&script=sci_arttext
156. Venzke D, Serpa R, Lima MC, Ribeiro GA, Freitag RA, Bretanha LC, Gouvêa DP. Eficiência do Cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio em teste de atividade antibacteriana “in vitro”. XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul). FURB, nov 2008.
157. Ruiz-Bustos E, Velazquez C, Garibay-Escobar A, García ZM, Plascencia-Jatomea MO, Cortez-Rocha J, Hernandez-Martínez, Robles-Zepeda RE. Antibacterial and antifungal activities of some Mexican medicinal plants. *Journal of Medicinal Food*. 2009;12(6):1398–402. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/pdfplus/10.1089/jmf.2008.0205>
158. Silva Junior IF, Cechinel Filho V, Zacchino SA, Lima JCS, Martins DTO. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. *Rev Bras Farmacogn*. 2009;19: 242-8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000200011
159. Stehling EG, Silveira WD, Leite DS. Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2008;12(1):86-8.
160. Mendes LPM, Maciel KM, Vieira ABR, Mendonça LCV, Silva RMF, Rolim Neto PJ, et al. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2011;32(1):121-5. Available from: http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/view/1216
161. Wei GX, Xu X, Wu CD. In vitro synergism between berberine and miconazole against planktonic and biofilm *Candida* cultures. *Arch Oral Biol*. 2011; 56(6):565-72.

162. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986 may 22;89(2):271-7.
163. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. *Technol*. 1997;30:609-15.
164. Yamaguchi T, Takamura H, Matoba TTJ. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 1998;62(6):1201-4.
165. Lim YY, Lim TT, Tee JJ. Antioxidant properties of several tropical fruits: a comparative study. *Food Chemistry*. 2007;103:1003-8.
166. Aquino Neto FR; N DSS. *Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência. 2003;30-9p.
167. Bastos MLA, Sarmiento PA, Veríssimo RCSS, Lúcio IML, Rocha EMM da, Santos RFEP dos, Conserva LM. Pesquisa na enfermagem: rumo à interdisciplinaridade e difusão do conhecimento por meio de ensaios pré-clínicos. In: 16º SENPE. Campo grande-MS:(60).2011Jul. Available from: <http://www.abeneventos.com.br/16senpe/senpe-trabalhos/files/0060.pdf>
168. Diretórios de grupos de pesquisa no Brasil. Available from: <http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/>
169. Teixeira LS, Bastos MLA. Avaliação do potencial citotóxico de extratos de espécies vegetais da família *Polygonaceae* ativas contra *Staphylococcus aureus*. In: XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010, João Pessoa/PB. Anais do XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010.
170. Silva ISM, Bastos MLA. Avaliação do potencial citotóxico de extratos da *Merremia Aegyptia* (L.) Urb. (Convolvulaceae) frente à *Artemia salina* Leach. In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010, João Pessoa/PB. Anais do XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010.
171. Sobreira OJ, Conserva LM, Bastos MLA. Investigação fitoquímica, avaliação da atividade larvicida e toxicidade da *Artemia salina* Leach de extratos da *Swartzia apetala Raddi* (Fabaceae). In: 32 RSBQ, 2009, Fortaleza. Anais da 32 RSBQ, 2009.
172. Bastos, MLA. Escala de Mac Farland. In: Avaliação da atividade antimicrobiana “*in vitro* e *in vivo*” e estudo químico biomonitorado de *Piper hayneanum* C.DC. (Piperaceae) e *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae). [dissertação] Maceió: Universidade

- Federal de Alagoas; 2008. Available from:
http://bdtd.ufal.br/tde_busca/processaPesquisa.php?pesqExecutada=1&id=277
173. Ache tudo e região. Mapa de Alagoas; 2012. Available from:
http://www.achetudoeregiao.com.br/AL/alagoas_interior.htm
174. Flimar blog spot. Mapa da região de Marechal Deodoro; 2010. Available from:
<http://flimar.blogspot.com.br/2010/04/mapa-da-regiao-de-marechal-deodoro.html>
175. Blanco FM. Cocos nucifera; 2009. Available from:
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cocos_nucifera_Blanco2.364.png
176. Biovera. Rotaevaporador; 2011. Available from:
<http://www.biovera.com.br/produtos/rotaevaporador/rotaevaporador-ika-rv10-digital/>
177. Cial. Banho Maria; 2012. Available from: http://www.cial-paulinia.com.br/produto_detalhes.asp?p=17488
178. Smith AC. *S. aureus*, 2007. Available from:
<http://www.life.umd.edu/cbm/faculty/asmith/smith2.html>
179. Todar K, 2012. *S. aureus*: Micrografia eletrônica. Available from:
<http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>

APÊNDICE A - Revisão Integrativa submetida à publicação:**ATIVIDADE BIOLÓGICA DO *COCOS NUCIFERA* L. E SEU PERFIL NO TRATAMENTO DE DOENÇAS: UMA REVISÃO INTEGRATIVA***

Cristiane do Nascimento Tavares Figueira¹, Maria Lysete de Assis Bastos², Eliane Aparecida Campesatto³, Ingrid Martins Leite Lúcio⁴, Regina Maria dos Santos⁴, Ednaldo Cavalcante de Araújo⁵

Categoria do Artigo: Revisão

Autor correspondente:

Maria Lysete de Assis Bastos

Universidade Federal de Alagoas

Av. Lourival Melo Mota, s/n Campus A.C. Simões - 57072-970 - Maceió-AL, Brasil.

E-mail: lysetebastos@gmail.com

*Artigo elaborado a partir da dissertação “Avaliação do potencial antimicrobiano, antioxidante, citotoxicidade e cicatrizante de extratos brutos do *Cocos nucifera* Linn.” desenvolvida no Programa de Pós-graduação em Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas – Mestrado Acadêmico/Ufal/PPGENf. Maceió/AL, Brasil. 2012, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Alagoas/FAPEAL e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq.

¹Enfermeira, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Escola de Enfermagem e Farmácia (PPGENf/Esenfar) da Universidade Federal de Alagoas (Ufal). Integrante do Grupo de Pesquisa Núcleo de Pesquisa e Inovação Tecnológica em Tratamento de Feridas/Ufal/CNPQ. Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n Campus A.C. Simões. Maceió/AL, Brasil. CEP 57072-970. E-mail: tiane_cristavares@hotmail.com

²Enfermeira, Doutora em Ciências, Docente da Graduação em Enfermagem e do PPGENf/Esenfar/Ufal. Líder do Grupo de Pesquisa Núcleo de Pesquisa e Inovação Tecnológica em Tratamento de Feridas/Ufal/CNPQ. Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n Campus A.C. Simões. Maceió/AL, Brasil. CEP: 57072-970. E-mail: lysetebastos@gmail.com

³Farmacêutica, Doutora em Ciências Biológicas, Docente do Setor de Fisiologia e Farmacologia do ICBS/Ufal e do PPGENf/Esenfar/Ufal, Grupo de Pesquisa em Imunologia. Endereço Maceió/AL, Brasil. E-mail: eliane_campesatto@hotmail.com

⁴Enfermeira, Doutora em Enfermagem, Docente da Graduação em Enfermagem e do PPGENf/Esenfar/Ufal. Vice-líder do Grupo de Pesquisa Núcleo de Pesquisa e Inovação Tecnológica em Tratamento de Feridas/Ufal/CNPQ. Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n Campus A.C. Simões. Maceió/AL, Brasil. CEP 57072-970. E-mail: ingrid_lucio@yahoo.com.br

⁴Enfermeira. Doutora em Enfermagem, Docente da Graduação em Enfermagem e do PPGENf/Esenfar/Ufal. Grupo de Pesquisa Procuidado/Ufal/CNPQ. Endereço Maceió/AL, Brasil. E-mail: relpesantos@gmail.com

⁵Enfermeiro, Pós-doutor em Enfermagem, Docente da Graduação e do PPGENf/Departamento de Enfermagem do Centro de Ciências da Saúde/UFPE. Líder do Grupo de Pesquisa Saúde Integral do Adolescente e Saúde Coletiva e Práticas Integrativas e Complementares em Saúde/UFPE/CNPQ. Editor-Chefe da Revista de Enfermagem UFPE on line. Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária. Recife/PE, Brasil. CEP: 50670-901. E-mails: ednenjp@gmail.com / reuol.ufpe@gmail.com

ATIVIDADE BIOLÓGICA DO *COCOS NUCIFERA* L. E SEU PERFIL NO TRATAMENTO DE DOENÇAS: UMA REVISÃO INTEGRATIVA*

RESUMO

O *Cocos nucifera* é uma palmeira conhecida como coqueiro. Esta revisão integrativa analisou a produção científica sobre a atividade biológica do coqueiro no tratamento de doenças. Foram incluídos 14 artigos com busca em bases de dados, no período de 2002 a 2011. Os resultados indicaram que a maioria dos estudos foram publicados em periódicos internacionais, porém produzidos por brasileiros. Na análise constatou-se que, nove artigos descrevem as atividades biológicas das fibras das cascas e cascas do fruto do *C. nucifera*. Esta planta tem as seguintes indicações terapêuticas: antioxidante, antimicrobiana, leishmanicida, anti-helmíntica, anti-inflamatória, antinociceptiva, antineoplásica, pró-inflamatória e não tóxica, além de tratar diabetes e hiperplasia prostática. Assim, futuras investigações devem ser desenvolvidas, na busca de novas atividades biológicas e consolidação das já relatadas. Ressalta-se que pesquisadores enfermeiros necessitam engajarem-se no campo da pesquisa básica, visando a consolidar a inovação tecnológica na Enfermagem.

PALAVRAS-CHAVE: Terapia biológica; Coqueiro; Enfermagem.

INTRODUÇÃO

As plantas têm sido utilizadas desde a antiguidade, como fonte de alimento e no tratamento de diversas doenças que acometem o homem. Desde as duas últimas décadas do século XX observa-se uma crescente tendência mundial, do uso de plantas como recurso terapêutico, influenciado por fatores econômicos, sociais e culturais⁽¹⁾.

O emprego de plantas como tratamento alternativo vem sendo estimulado pela Organização Mundial de Saúde, por meio de programas. No Brasil, o Ministério da Saúde tem investido na aplicabilidade de terapias complementares na rotina dos serviços de saúde, sendo uma delas, a instituição da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

(PNPIC) em 2006, em referência a manifestação do conhecimento popular em saúde, para uma nova abordagem terapêutica, que favoreça e promova a universalização do acesso aos usuários do Sistema Único de Saúde/Sus⁽²⁾.

Um estudo relatou que extratos de plantas mostraram-se eficientes no controle de diversas doenças, bem como, o envolvimento de pesquisadores das áreas de farmácia e medicina na investigação de atividades biológicas de plantas medicinais orientadas pelo uso popular⁽³⁾. Nesse contexto, incentiva-se a participação do enfermeiro para além de usuário de novas tecnologias e, seu engajamento no desenvolvimento de inovações tecnológicas nessa área⁽⁴⁾, visando a promoção da saúde, com ações que possam ser implementadas pelo Sus.

O Brasil é detentor da maior variedade de plantas do mundo, porém menos de 10% foram avaliadas com relação aos seus aspectos biológicos. A flora brasileira possui cerca 55 mil espécies, que corresponde a aproximadamente 22 % do universo de plantas conhecidas no planeta⁽⁵⁾.

O *Cocos nucifera* Linn. é uma palmeira, pertencente à família *Palmae*, conhecida, popularmente, no Brasil, como coqueiro. Coco é o fruto produzido pelo coqueiro uma espécie vegetal de região tropical, oriunda do continente asiático, mais precisamente da região Indo-Malásia. Esta palmeira foi introduzida no Brasil pelos portugueses, com boa adaptação⁽⁶⁾. O coqueiro tem importância mundialmente reconhecida, tanto para consumo "*in natura*" quanto para fins industriais.

O Nordeste brasileiro tem condições edafoclimáticas satisfatórias para seu cultivo⁽⁷⁾. Frente a esta constatação o *C. nucifera* tem potencial para desenvolvimento de pesquisas que busquem maiores evidências de sua atividade biológica. A concha de coco tem composição química idêntica à madeira, adequada para a extração de compostos fenólicos (taninos, flavonoides e xantonas), responsáveis pela atividade antimicrobiana, antiulcerogênica, antineoplásica e antiinflamatória⁽⁸⁻¹⁰⁾.

Pelo exposto, o objetivo deste estudo é analisar a produção científica sobre a atividade biológica do coqueiro no tratamento de doenças. Este estudo justifica-se por ampliar a fundamentação teórica de uma pesquisa experimental vinculada ao PPGEnf/Ufal à nível de mestrado e ao Laboratório de pesquisa em Tratamento de Feridas – LpTF/Ufal.

METODOLOGIA:

Optou-se pelo método da revisão integrativa para reunir e sintetizar o conhecimento existente sobre a atividade biológica do *C. nucifera* L., referente ao seu perfil para tratamento de doenças. Este tipo de revisão favorece discussões sobre métodos, resultados de pesquisas e reflexões para o desenvolvimento de futuros estudos⁽¹¹⁻¹²⁾.

Nesta revisão foram adotadas as etapas: estabelecimento da questão de pesquisa, busca na literatura para identificar o tema escolhido; seleção dos estudos a serem incluídos; avaliação da literatura; análise e síntese dos dados⁽¹¹⁾. Para conduzir esta revisão, a seguinte questão foi formulada: Que conhecimentos foram produzidos sobre as atividades biológicas dos extratos das diferentes partes do *C. nucifera* L.?

Para a seleção dos artigos foram consultadas as seguintes bases de dados: *National Library of Medicine* (MEDLINE), *Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde* (LILACS), *Chemical Abstracts Service* (*SciFinder Scholar/CAS*), Banco de Dados em Enfermagem (BDEnf), *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), por meio dos seguintes descritores e suas combinações nas línguas portuguesa, espanhola e inglesa: coqueiro (*coco; coconut*) and atividade biológica (*actividad biológica; biological activity*) or atividade antimicrobiana (*actividad antimicrobiana; antimicrobial activity*).

Buscaram-se artigos que respondessem a questão da revisão adotando como critérios de inclusão: artigos publicados no período de 2002 a 2011 em periódicos nacionais e internacionais (português, espanhol e inglês); que descrevem a atividade biológica do *C. nucifera* com resumo e texto completos disponíveis *online*; e exclusão, artigos relacionados à

polpa e água do fruto do coqueiro e artigos que não se relacionam com o uso biológico. Foram identificadas 180 produções. Foi procedida leitura dos resumos e selecionadas as produções para leitura na íntegra, sendo a amostra final constituída por 14 artigos.

Para a coleta de dados dos artigos elaborou-se um formulário que contemplou informações sobre identificação do artigo, objetivo dos estudos, características metodológicas da pesquisa, análise dos dados, resultados, discussão e conclusões⁽¹¹⁾. A apresentação dos resultados e discussão dos dados foi realizada de forma descritiva possibilitando a aplicabilidade desta revisão na prática da pesquisa básica, bem como mostrar a importância do envolvimento do enfermeiro neste tipo de investigação.

RESULTADOS

Analisaram-se 14 artigos que atenderam aos critérios de inclusão, localizados nas bases de dados: seis no *SciFinder Scholar/CAS*, cinco no MEDLINE, dois no LILACS e um no SciELO. Destes, 13 estão na língua inglesa e um na portuguesa. Não foram encontradas publicações sobre esta temática em periódicos da Enfermagem. No Quadro 1 estão algumas informações sobre os artigos da revisão e no Quadro 2 a síntese dos artigos selecionados.

Quadro 1 - Artigos incluídos na revisão integrativa. Maceió/AL, 2012.

Título do artigo	Periódico	País que publicou	Idioma	Ano
1. Comparative in vitro antioxidant activity of different parts of <i>C. nucifera</i> on reactive oxygen and nitrogen specie ⁽⁹⁾	Int J Pharm Pharm Sci	Índia	Inglês	2011
2. Preliminary phytochemical screening and anti-bacterial activity of <i>C. nucifera</i> L. root ⁽¹⁰⁾	Res J pharm Biol Sci.	Índia	Inglês	2011
3. <i>In vitro</i> antilisterial properties of crude aqueous and n-hexane extracts of the husk of <i>C. nucifera</i> ⁽¹³⁾	Afr. J. Biotechnol	Nigéria	Inglês	2011
4. <i>In vitro</i> antibacterial properties of crude aqueous and n-hexane extracts of the husk of <i>C. nucifera</i> ⁽¹⁴⁾	Molecules.	África do Sul	Inglês	2011
5. Effect of ethyl acetate extract from husk fiber water of <i>C. nucifera</i> in Leishmania braziliensis infected hamsters ⁽¹⁵⁾	Rev. bras. farmacogn.	Brasil	Inglês	2011

Continua

<i>Continuação</i>				
6. Anthelmintic activity of <i>C. nucifera</i> L. on intestinal nematodes of mice ⁽¹⁶⁾	Res Vet Sci.	Brasil	Inglês	2010
7. Avaliação toxicológica e efeito do extrato acetato de etila da fibra de <i>Cocos nucifera</i> L. (Palmae) sobre a resposta inflamatória <i>in vivo</i> ⁽¹⁷⁾	Rev. bras. plantas. med;	Brasil	Português	2009
8. American palm ethnomedicine: a meta-analysis ⁽¹⁸⁾	J Ethnobiol Ethnomed	Polônia	Inglês	2009
9. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities from <i>Cocos nucifera</i> L. (Palmae) ⁽¹⁹⁾	J Ethnopharma col	Brasil	Inglês	2009
10. The husk fiber of <i>Cocos nucifera</i> L. (Palmae) is a source of anti-neoplastic activity ⁽²⁰⁾	Braz J Med Biol Res.	Brasil	Inglês	2007
11. Antinociceptive and free radical scavenging activities of <i>C. nucifera</i> L. (Palmae) husk fiber aqueous extract ⁽²¹⁾	J Ethnopharma col	Brasil	Inglês	2004
12. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of <i>C. nucifera</i> L. (Palmae) ⁽²²⁾	Res Microbiol.	Brasil	Inglês	2004
13. The effect of a catechin-rich extract of <i>Cocos nucifera</i> on lymphocytes proliferation ⁽²³⁾	Phytother Res.	Brasil	Inglês	2003
14. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenols from <i>C. nucifera</i> L. (Palmae) husk fiber extract ⁽²⁴⁾	Res Microbiol.	Brasil	Inglês	2002

Quadro 2 - Síntese dos artigos incluídos na revisão integrativa. Maceió/AL, 2012.

Nº do Artigo/Objetivo	Metodologia	Resultados	Indicação Terapêutica
1. Avaliar a atividade do <i>C. nucifera</i> como antioxidante ⁽⁹⁾	Experimental <i>in vitro</i> ⁽⁹⁾	Testes de fenóis totais revelaram ação antioxidante ⁽⁹⁾	Antioxidante ⁽⁹⁾
2. Aferir a atividade antibacteriana <i>C. nucifera</i> ⁽¹⁰⁾	Experimental <i>in vitro</i> ⁽¹⁰⁾	O extrato é ativo para <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> ⁽¹⁰⁾	Atividade antibacteriana ⁽¹⁰⁾
3. Avaliar extratos da casca do <i>C. nucifera</i> para infecção <i>Listeria</i> ⁽¹³⁾	Experimental <i>in vitro</i> ⁽¹³⁾	O extrato foi ativo contra 30 e o aquoso 29 diferentes cepas de <i>Listeria</i> ⁽¹³⁾	Atividade antilisterial ⁽¹³⁾
4. Testar o potencial antimicrobiano dos extratos brutos da casca do <i>C. nucifera</i> ⁽¹⁴⁾	Experimental <i>in vitro</i> ⁽¹⁴⁾	O extrato aquoso foi ativo contra 17 e 31 e o n-hexano 21 e 38 bactérias e vibriões, respectivamente ⁽¹⁴⁾	Atividade antibacteriana ⁽¹⁴⁾
5. Avaliar o extrato das fibras do <i>C. nucifera</i> contra a <i>L. braziliensis</i> ⁽¹⁵⁾	Experimental <i>in vivo</i> ⁽¹⁵⁾	Ausência de estímulo imunológico, porém, os animais melhoraram ⁽¹⁵⁾	Controle da <i>L. braziliensis</i> ⁽¹⁵⁾

Continua

Continuação			
6. Avaliar a atividade anti helmíntica do extrato da casca do coco ⁽¹⁶⁾	Experimental <i>in vivo</i> ⁽¹⁶⁾	Ratos tratados com extrato mostraram redução da carga parasitária ⁽¹⁶⁾	Controle de nematóides intestinais ⁽¹⁶⁾
7. Investigar o extrato acetato de etila de <i>C. nucifera</i> sobre a inflamação tópica ⁽¹⁷⁾	Experimental <i>in vivo</i> ⁽¹⁷⁾	O extrato tem fenóis e esteroides, foi atóxico e não inibiu a inflamação ⁽¹⁷⁾	Atóxico ⁽¹⁷⁾
8. Analisar estudos sobre os usos medicinais das palmeiras americanas ⁽¹⁸⁾	Estudo de Revisão ⁽¹⁸⁾	Das palmeiras estudadas, 106 são tidas como medicinal ⁽¹⁸⁾	Estudo de revisão da Palmae ⁽¹⁹⁾
9. Testar extrato e frações de <i>C. nucifera</i> para inflamação e dor ⁽¹⁹⁾	Experimental <i>in vivo</i> ⁽¹⁹⁾	Agiram como analgésico e inibiram o edema de pata induzido em ratos ⁽¹⁹⁾	Analgésico e antiinflamatório ⁽¹⁹⁾
10. Investigar a atividade anti-tumoral da fibra da casca do <i>C. nucifera</i> ⁽²⁰⁾	Experimental <i>in vitro</i> ⁽²⁰⁾	Extratos e frações do <i>C. nucifera</i> têm atividade antitumoral ⁽²⁰⁾	Fonte de antineoplásicos ⁽²⁰⁾
11. Avaliar o efeito analgésico e anti-radical livre da casca de <i>C. nucifera</i> ⁽²¹⁾	Experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ⁽²¹⁾	Ausência de irritação dérmica e ocular por via tópica. <i>In vitro</i> teve ação anti-radicalar ⁽²¹⁾	Atóxico para pele e mucosa ocular. É anti-radicalar ⁽²¹⁾
12. Avaliar o <i>C. nucifera</i> contra <i>L. amazonensis</i> ⁽²²⁾	Experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ⁽²²⁾	A CIM do extrato inibiu o crescimento do parasita em camundongo ⁽²²⁾	Potencial leishmanicida ⁽²²⁾
13. Avaliar as catequinas do <i>C. nucifera</i> como anti-tumoral ⁽²³⁾	Estudo experimental <i>in vitro</i> ⁽²³⁾	Proliferação e viabilidade celular em células K562 e linfócitos normais ⁽²³⁾	Anti-tumoral para linfócitos ⁽²³⁾
14. Avaliar a atividade antimicrobiana do <i>C. nucifera</i> ⁽²⁴⁾	Experimental <i>in vitro</i> ⁽²⁴⁾	Mostrou atividade contra <i>S. aureus</i> e aciclovir-resistente ⁽²⁵⁴⁾	Antimicrobiano ⁽²⁴⁾

DISCUSSÃO

Os estudos de 1 a 4, 10 e 14 foram experimentais *in vitro*, de 5 a 7, 9 e 10 foram *in vivo*, o 8 tratou de uma revisão do tipo metanálise, os estudos 11 e 12 utilizaram experimentos *in vitro* e *in vivo*, na mesma pesquisa. Apesar da maioria dos artigos serem de origem brasileira, predominou a publicação em inglês, significando a preocupação de internacionalizar o conhecimento produzido no país.

Contatou-se maior incidência de estudos brasileiros em relação ao restante do mundo, sendo isso, possivelmente, influenciado pelas condições propícias para o cultivo desta planta no Brasil. Quanto à autoria, nove foram de pesquisadores brasileiros e cinco do exterior, dos

seguintes países: Índia, Nigéria, Polônia e África do Sul. Não foi identificada a categoria profissional dos pesquisadores, no entanto todos os estudos foram realizados em laboratórios de pesquisa experimental de universidades, envolvendo mais de uma área do conhecimento.

Dos sete estudos experimentais *in vitro*, quatro averiguaram a atividade antimicrobiana das cascas, fibras do fruto e raízes do *C. nucifera*. Dois deles buscaram investigar a inibição da proliferação de células neoplásicas nas cascas do fruto, bem como das catequinas isoladas desta mesma parte. E um estudo utilizou diversas partes testando a atividade antioxidante desta planta.

Identificou-se nos estudos *in vitro* que o *C. nucifera* possui atividade antimicrobiana, contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marscens*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Vibrio vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. sp. V. metschnikovii*, *V. parahaemolyticus*^(9-10,14) e a *Listeria. monocytogenes*⁽¹³⁾ - bactéria patogênica, capaz de causar meningite e induzir aborto⁽¹⁴⁾. Também, se evidenciou que o extrato bruto e as catequinas das fibras das cascas apresentaram atividade contra o herpes vírus simples humano tipo 1, resistente ao Aciclovir, sendo inativo para os fungos *Candida albicans*, *Fonsecaea pedrosoi* e *Cryptococcus neoformans*⁽²⁴⁾.

Quanto ao potencial antitumoral encontraram-se dois estudos que relatam esta atividade contra a proliferação de células K562, responsáveis pela Leucemia Mielóide. Tanto o extrato das fibras das cascas⁽²⁰⁾, quanto as catequinas isoladas das cascas do *C. nucifera*⁽²³⁾ produziram uma inibição dose-dependente, avaliadas pelo teste do MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio] – método colorimétrico de redução do sal de tetrazólio avaliando a citotoxicidade da amostra testada⁽²⁵⁾ e de estudo de ciclo por citometria de fluxo para conferir o efeito antiproliferativo sobre a linhagem K562⁽²⁶⁾.

A atividade antioxidante foi encontrada em um artigo, que investigou o potencial de diferentes partes do *C. nucifera*⁽⁹⁾ por meio dos métodos da capacidade redutora de fenóis totais – quantificação espectrométrica de compostos fenólicos utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e pela atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH⁽⁹⁾.

Dos quatro artigos experimentais *in vivo*, um avaliou o potencial leishmanicida do extrato das cascas do *C. nucifera*. Neste estudo foram usados 12 *hamsters* divididos em três grupos, no qual o grupo 1 recebeu apenas o extrato, o grupo 2 foi infectado com a *L. braziliensis* e o grupo 3 foi infectado com a *L. braziliensis* e tratado com o extrato. Nestes animais observou-se que as dosagens séricas do hemograma comprovaram a não eliminação do agente etiológico, pela ausência de estimulação do sistema imunológico. Entretanto, os animais apresentaram melhoras nas condições físicas⁽¹⁵⁾, indicando que seu uso etnobotânico para tratar essa doença deve ser mais estudado.

O artigo seis trabalhou com ratos para avaliar a atividade anti-helmíntica de extratos do *C. nucifera*. Os animais foram infectados e distribuídos em seis grupos. Quatro grupos foram tratados com o extrato em diferentes dosagens, um com a droga padrão e o outro com dimetilsulfóxido a 3%, como controle negativo. Observou-se que o extrato butanólico na dose de 1000 mg/Kg de peso reduz a carga parasitária. Testes fitoquímicos revelaram a presença de triterpenos, saponinas e taninos condensados neste extrato⁽¹⁶⁾.

Dois dos estudos investigaram a ação antiinflamatória de extrato das cascas do *C. nucifera*. No artigo sete, além da atividade antiinflamatória, também se realizou testes de toxicidade. Os ensaios foram conduzidos usando-se camundongos, sendo a inflamação tópica induzida por xileno aplicado na orelha e tratados com dose única diária do extrato por via orogástrica. No final do experimento sacrificaram-se os animais para contagem dos leucócitos totais, pesagem de parte das orelhas, fígado, baço, timo e rim. Não foi identificado efeito

tóxico e a nem redução da inflamação induzida⁽¹⁷⁾. O artigo nove utilizou ratos para avaliar analgesia e atividade antiinflamatória do extrato e frações das fibras das cascas do *C. nucifera*, apresentando resultados condizentes com a ação antinociceptiva e antiinflamatória⁽¹⁹⁾.

Uma revisão do tipo metanálise foi encontrada no estudo oito. Ela identificou 703 artigos que descrevem sobre as palmeiras mundiais. Destes, 106 relatam o uso medicinal, com destaque para o *C. nucifera* que apresentou atividades biológicas no tratamento de distúrbios gastrintestinais e respiratórios, doenças dermatológicas e microbianas, dores do sistema musculoesquelético, hiperplasia prostática, diabetes e leishmaniose⁽¹⁸⁾.

Dos artigos selecionados dois realizaram estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*. No estudo 11 realizou-se experimento *in vitro* para investigar a atividade antioxidante das fibras das cascas do *C. nucifera*, através do teste de DPPH e a atividade antinociceptiva foi avaliada *in vivo* usando camundongos nos testes de contorção e placa quente, observando-se que a administração do extrato atenuou a resposta à dor induzida pelo ácido acético e ao calor pela placa quente. Também, realizou-se o teste de toxicidade dérmica em coelhos, cuja resposta foi a ausência de toxicidade⁽²¹⁾.

No estudo 12 programou-se ensaio *in vitro* utilizando formas promastigotas da *L. amazonensis* frente aos extratos polifenólicos das fibras das cascas do *C. nucifera*, por um período de incubação de 24 horas em meio de cultivo. A concentração inibitória mínima deste extrato foi de 10 µg/mL, sendo considerado ativo. Frente a este resultado conduziu-se ensaio *in vivo* de pré-tratamento dos macrófagos peritoniais em camundongos com 10 mg/mL do mesmo extrato, diminuindo em 44% o índice de agregação entre esses macrófagos e promastigotas da *L. amazonensis*. Estes resultados indicam novas perspectivas para desenvolvimento de fitoterápicos contra a leishmaniose⁽²²⁾.

Em relação ao enquadramento metodológico verificou-se predominância de estudos quantitativos experimentais com foco na pesquisa básica (93%) e emprego de uma metanálise (7%); demonstrando a necessidade de mais estudos que abordem esse tipo de revisão.

O tratamento dos dados nos 14 artigos explorados consistiu no uso da estatística com delineamento experimental, pela estatística descritiva (média, variância, desvio padrão, intervalo de confiança, nível de significância e coeficiente de variação), testes de comparação de médias (Tukey, Duncan e Dunnett), Análise de variância (ANOVA), testes de relação e correlação, bem como, a utilização de programas softwares [Statsoft versão 5.0; GraphPad Prism 3,0, Statistical Analysis System 4.1]. A estatística é uma ciência responsável pela interpretação dos dados de uma pesquisa, visando compreender as situações encontradas para tirar conclusões acerca do objeto de estudo⁽²⁷⁾.

O uso das plantas, em especial, do *C. nucifera*, com atividade contra diversas doenças representa uma fonte, em potencialidade, de acesso para a população mais carente, possibilitando a descoberta de novas terapias que apresentam tratamento de difícil prognóstico ou oneroso. Entretanto, como qualquer outra forma de tratamento, aqueles oriundos de plantas, também, devem apresentar eficácia e segurança para uso⁽²⁸⁾.

Nessa perspectiva, os enfermeiros no desempenho de suas funções, especialmente no campo da saúde pública, podem orientar os usuários interessados em utilizar a medicina natural, com respaldo em bases científicas⁽²⁹⁾. Também, cresce o interesse destes profissionais na participação em grupos de pesquisa que visam esta linha de investigação, uma vez que, o campo da pesquisa básica na Enfermagem é um novo horizonte a ser explorado, com possibilidade de impulsionar a profissão para o atendimento das políticas de inovação tecnológica do país.

Diante do exposto, afirma-se, que existem fortes evidências para o uso medicinal do *C. nucifera*, por apresentar diversas atividades biológicas no tratamento de algumas patologias, recomendando-se a continuação de pesquisas básicas experimentais, na busca de novos fitoterápicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação aos 14 artigos analisados, constatou-se que, a maioria, descreve as atividades biológicas das fibras das cascas e cascas do fruto do *C. nucifera*, não sendo encontrados estudos referentes às folhas e caule. As atividades biológicas identificadas apresentam indicação terapêutica como antioxidante, antimicrobiana, leishmanicida, anti-helmíntico, anti-inflamatória, antinociceptiva/analgésica, antineoplásica, pró-inflamatória e não tóxica, além de tratar **diabetes e hiperplasia prostática**.

Os estudos foram realizados em laboratórios de pesquisa experimental envolvendo mais de uma área do conhecimento. Esta temática tem sido alvo de investimento das políticas de saúde e inovação tecnológica no Brasil, o que torna imprescindível a continuação de estudos pré-clínicos e clínicos visando à aplicabilidade de extratos do *C. nucifera* em humanos, na perspectiva da obtenção de tratamentos naturais, menos agressivos para o paciente.

O envolvimento das várias áreas do conhecimento nesse tipo de pesquisa é importante, pois favorece o encontro de saberes na busca para melhorar as condições de saúde da população. Neste contexto, a Enfermagem deve estar engajada, pois pode contribuir do início ao final do processo investigatório.

REFERÊNCIAS

1. Hentz SM, Santin NC. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) contra *Salmonella* sp. Evidência. 2007;7(2):93-100.
2. Ministério da Saúde (BR). Portaria nº 97/GM de 3 de maio de 2006. Divulga a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sus. Diário Oficial da União, Brasília, 04 maio de 2006. Seção 1, p. 20.
3. Duarte, MCT. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais. 2006; 7: 1-16.
4. Koerich MHAL, Vieira RHG, Silva DE, Erdmann AL, Meirelles BHS. Produção tecnológica brasileira na área de Enfermagem: avanços e desafio. Rev Gaúcha Enferm. 2011;32(4):736-43.
5. Cunha PLR, Paula RCM, Feitosa JPA. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. Quím. Nova. 2009; 32(3): 649-60.

6. Vale AT, Barroso RA, Quirino WF. Caracterização da biomassa e do carvão vegetal do coco-da-baía (*C. nucifera* L.) para uso energético. *Biomassa & energia*. 2004;1(4):65-70.
7. Fontes HR, Wanderley.M. Situação atual e perspectivas para a cultura do coqueiro no Brasil. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros; 2006.
8. Rodrigues S; Pinto GA; Fernandes FA. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrason Sonochem*. 2008;15(1):95-100.
9. Naskar S, Mazumder UK, Pramanik G, Bala A, Haldar PK, Islam A, Gupta M. Comparative in vitro antioxidant activity of different parts of *C. nucifera* on reactive oxygen and nitrogen specie. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2011;3(3):104-7.
10. Sivakumar MK, Moideen MM, Varghese R, Sheik B, Dhanapal CK. Preliminary phytochemical screening and antibacterial activity of *C. nucifera* L. root. *Res J Pharm Biol Sci*. 2011;2(4):468-77.
11. Mende KDS, Silveira RCCP, Galvão CM. Revisão integrativa: método de pesquisa para incorporação de evidências na saúde e na Enfermagem. *Texto Contexto Enferm*. 2008;17(4):758-64.
12. Soares MM, Silva LOL, Dias CA, Rodrigues SM, Machado CJ. Adesão do idoso ao tratamento da hipertensão arterial sistêmica: revisão integrativa. *Cogitare enferm*. 2012;17(1):144-50.
13. Akinyele TA, Akinpelu DA, Okoh AI. *In vitro* antilisterial properties of crude aqueous and hexane extracts of the husk of *C. nucifera*. *Afr. J. Biotechnol*. 2011; 10(41):8117-21.
14. Akinyele TA, Okoh OO, Akinpelu DA, Okoh AI. In-vitro antibacterial properties of crude aqueous and n-hexane extracts of the husk of *Cocos nucifera*. *Molecules*. 2011; 16(3): 2135-45.

15. Freitas JCC, Nunes-Pinheiro DC, Pessoa AWP, Silva LCR, Girão VCC, Lopes-Neto BE, et al. Effect of ethyl acetate extract from husk fiber water of *Cocos nucifera* in *Leishmania braziliensis* infected hamsters. Rev. bras. farmacogn. 2011;21(6):1006-11.
16. Costa CTC, Bevilaqua CML, Morais SM, Camurça-Vasconcelos ALF, Maciel MV, Braga RR, et al. Anthelmintic activity of *C. nucifera* L. on intestinal nematodes of mice. Res Vet Sci. 2010;88(1):101-3.
17. Silva LCR, Nunes-Pinheiro DCS, Morais SM, Lopes-Neto BE, Santos GJL, Campello CC. Avaliação toxicológica e efeito do extrato AcEOt da fibra de *C. nucifera* L. (Palmae) sobre a resposta inflamatória *in vivo*. Rev. bras. plantas. med. 2009; 11(4):429-34.
18. Sosnowska J, Balslev H. American palm ethnomedicine: A meta-analysis. J Ethnobiol Ethnomed. 2009; 5:43.
19. Rinaldi S, Silva DO, Bello F, Alviano CS, Alviano DS, Matheus ME, Fernandes PD. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Cocos nucifera* L. (Palmae). J Ethnopharmacol. 2009;122(3):541-6.
20. Koschek PR, Alviano CS, Gattass CR. The husk fiber of *Cocos nucifera* L. (Palmae) is a source of anti-neoplastic activity. Braz J Med Biol Res. 2007; 40(10):1339-43.
21. Alviano DS, Rodrigues KF, Leitão SG, Rodrigues ML, Matheus ME, Fernandes PD et al. Antinociceptive and free radical scavenging activities of *Cocos nucifera* L. (Palmae) husk fiber aqueous extract. J Ethnopharmacol. 2004;92(2-3):269-73.
22. Mendonça-Filho RR, Rodrigues IA, Alviano DS, Santos ALS, Soares RMA, Alviano CS et al. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). Res Microbiol. 2004;155(3):136-43
23. Kirszberg C, Esquenazi D, Alviano CS, Rumjanek VM. The effect of a catechin-rich extract of *C. nucifera* on lymphocytes proliferation. Phytother Res. 2003;17(9):1054-8.

24. Esquenazi D, Wigg MD, Miranda MMFS, Rodrigues HM, Tostes JBF, Rozental S. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Res Microbiol.* 2002;153(10):647-52.
25. Rahman S, Salehin F, Iqba A. *In vitro* antioxidant and anticancer activity of young *Zingiber officinale* against human breast carcinoma cell lines. *BMC Complement. Altern Med.* 2011;11:76.
26. Machado Jr JC, Florão A, Mattana FVR, Rocha FH, Santos CAM, Weffort-Santos AM. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. *Rev. bras. farmacogn.* 2006; 16(supl.):645-55.
27. Vieira S. Bioestatística. Tópicos Avançados. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.
28. Souza-Moreira TM, Salgado HRN, Pietro RCLR. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Rev. bras. farmacogn.* 2010;20(3):435-40.
29. Franca ISX, Souza JA, Baptista RS, Britto VRS. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Rev. bras. enferm.* 2008;61(2):201-8.

ANEXO A - Cópia da aprovação do projeto pelo Comitê de ética em pesquisa/ Ufal

De: comitedeetica@ufal.br <comitedeetica@ufal.br>

Data: 15 de dezembro de 2011 12:33

Assunto: Parecer do CEP

Para: lysetebastos@gmail.com

Boa tarde,

Informamos que o projeto de n° 018748/2011-71, com o título '**Avaliação do potencial antimicrobiano , anti-edematogênico, cicatrizante e toxicidade de extratos do *Cocos nucifera* Linn, *in vitro* e *in vivo***', está aprovado.

Atenciosamente,

Isabel Ferreira

Bolsista do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

ANEXO B - POP microdiluição para concentração inibitória mínima

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP			Pág 1 e 2
Código: LAB. – POP – AL 002	Emissão julho/2012	Vigência 1 ano	Próxima Revisão 22/Jul/2013	Versão nº 04
Área emitente: LpTF - Microbiologia				
ASSUNTO: Microdiluição em caldo MH para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM)				
Elaboração: Cristiane do Nascimento Tavares Figueira Orientação: Prof ^ª Dr ^ª Maria Lysete de Assis Bastos				

Este ensaio é realizado em placas estéreis de 96 poços com fundo em forma de “U”, que apresentam 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Os poços das colunas de 1 a 9 são destinados para o teste com amostras, enquanto os poços das colunas 10, 11 e 12 são destinados para o teste de controle do experimento, respectivamente, Controle de crescimento (CC), Controle negativo (CN) e Controle positivo (CP). Cada concentração da amostra é testada em triplicata e, portanto, em cada placa é possível testar três amostras distintas em triplicata simultaneamente (por exemplo: extrato X nas colunas 1, 2 e 3; extrato Y nas colunas 4,5 e 6; extrato Z nas colunas 7,8 e 9).

Este protocolo segue a Metodologia descrita por Ayres et al (2008):

1. Prepara o caldo **MH duplamente concentrado**, conforme rótulo do fabricante.
2. Pesa, em balança analítica, **2000 µg do extrato** e solubiliza em **1 ml de SF0,9% e 2 gotas de cremophor** (preparados na concentração de 2000 µg/mL)
3. Filtrados utilizando **filtros milipore 0,45 µm**
4. Em seguida inoculados **nas colunas de 1 a 9 da linha A. Um volume de 200 µL dos diversos extratos vegetais.**
5. Os demais orifícios preenchidos com **100 µL de caldo Mueller-Hinton.**
6. Uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada orifício da linha A é transferido para os orifícios da linha B, e após homogeneização, o mesmo volume é transferido para a linha C, repetindo-se este procedimento até a linha H, e desprezando-se após homogeneização o excesso da diluição, obtendo-se assim concentrações decrescentes dos extratos (1000 µg/mL-linha B; 500 µg/mL-linha C; 250 µg/mL-Linha D, e assim por diante)

7. Os inóculos microbianos na concentração de 0,5 de McFarland (10^8 UFC/mL) devem ser diluídos 1/10 em solução salina estéril (0,9%) e desta diluição um volume de **5 μ L (10^4 UFC/mL)** depositadas em todos os orifícios das linhas A-H.

8. Os orifícios das colunas 10, 11 e 12 foram destinados para os testes de controle do experimento.

coluna 10 reservada para o **controle negativo** da atividade inibitória do diluente utilizado na preparação dos extratos. Nesta coluna, a solução de 2 gotas de **cremophor com 1 ml de SF0,9%** foi diluída em caldo **Mueller-Hinton até a linha H** e o mesmo inóculo microbiano **5 μ L (10^4 UFC/mL)** acrescido.

coluna 11 recebe apenas caldo **Mueller-Hinton** e o inóculo microbiano **5 μ L (10^4 UFC/mL)**, possibilitando o **controle positivo da viabilidade bacteriana**.

coluna 12 recebe apenas caldo **Mueller-Hinton** para a verificação da **esterilidade da placa**.

9. As placas devem ser incubadas em estufa bacteriológica a **35 °C por 18 horas**.

10. Decorrido este intervalo de tempo deve ser acrescido a cada um dos orifícios **20 μ L de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifenil tetrazolium) a 0,5%** e as placas novamente **re-incubadas por mais três horas a 35 °C**.

11. Após esta última incubação a presença de uma coloração vermelha nos orifícios é interpretada como prova negativa do efeito inibitório do extrato, enquanto a ausência da coloração vermelha é considerada prova positiva da ação inibitória do extrato.

A CIM foi definida como a menor concentração do extrato em μ g/mL capaz de impedir o crescimento microbiano (impedir o aparecimento da coloração vermelha). Cada teste deve ser realizado em triplicata.

Preparo da solução do TTC a 0,5%

Pesar **0,05g** de TTC e solubilizar em **10 mL** de água destilada estéril.

Referência: Ayres MCC, Brandão MS, Vieira-Júnior GM, Menor JCAS, Silva HB, Soares MJS, Chaves MH. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Rev Bras Farmacogn*. 2008.(18) 90-7.

ANEXO C - Protocolo e POP de diluições para curva de calibração

Preparação de Solução Estoque 40mg/L:2mg DPPH + 50 ml MeoH.

- 40 mg/L: 1ml DPPH
875 µl 125 µl
- 35mg/L: 0,875 ml DPPH + 0,125 ml MeoH
750 µl 250 µl
- 30mg/L: 0,75 ml DPPH + 0,25 ml MeoH
625 µl 375 µl
- 25mg/L: 0,625 ml DPPH + 0,375 ml MeoH
500 µl 500 µl
- 20mg/L: 0,5 ml DPPH + 0,5 ml MeoH
375 µl 625 µl
- 15mg/L: 0,375 ml DPPH + 0,625 ml MeoH
250 µl 750 µl
- 10mg/L: 0,25 ml DPPH + 0,750 ml MeoH
125 µl 875 µl
- 5mg/L: 0,125 ml DPPH + 0,875 ml MeoH
25 µl 975 µl
- 1mg/L: 0,025 ml DPPH + 0,975 ml MeoH

Retirado 20 µl e depois 5 µl

Procedimento Operacional Padrão (POP) para Curva de calibração:

1. Ligado UV mini – 1240 / UV - VIS – spectrophotometers
2. Calibrado em intervalo UV 515 nm – 514 nm
3. Pipetado 1 ml de metanol a 100% para o controle branco
4. Realizado controle branco entre cada concentração.
5. Colocado as cubetas de 1 ml dentro da caixa para fotossensíveis.
6. Acionado o “Auto zero”
7. Pipetado 1 ml da solução de DPPH para testar a amostra de 40 mg/L de metanol.
8. Pipetado 875 µl de DPPH + 125 µl de Metanol para testar 35 mg/ml
9. Sucessivamente seguindo o protocolo de Curva de Calibração.
10. Tomando o cuidado de colocar primeiro a substância em menor quantidade

ANEXO D - Protocolo de preparação dos extratos e DPPH

Concentração dos extratos:

- 200 $\mu\text{l}/\text{mL}$: 200x 10ml de metanol= 2mg do extrato + 10mlMeOH
- 150 $\mu\text{l}/\text{mL}$: 200. $v_1= 150. 5$ $v_1= 3,75\text{ml}$
- 100 $\mu\text{l}/\text{mL}$: 200. $v_1= 100. 5$ $v_1= 2,5\text{ml}$
- 50 $\mu\text{l}/\text{mL}$: 100. $v_1= 50. 5$ $v_1= 2,5\text{ml}$
- 25 $\mu\text{l}/\text{mL}$: 50. $v_1= 25. 5$ $v_1= 2,5\text{ml}$
- 12,5 $\mu\text{l}/\text{mL}$: 25. $v_1= 12,5. 5$ $v_1= 2,5\text{ml}$

Preparo das soluções dos extratos brutos:

As soluções estoques foram preparadas a partir de 2mg de extrato bruto solubilizados em 10 mL de metanol. De cada extrato, foram testadas as concentrações 200, 150, 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, seguindo o Protocolo de Concentração dos Extratos abaixo. O ácido gálico e o BHT foram utilizados como antioxidantes padrões, submetido ao mesmo procedimento experimental: preparados na concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em MeOH espectroscópico.

POP de diluição dos extratos:

1. Pesado 0,002g do extrato. Solubilizado em 10 ml de metanol espectroscópico, em Balão volumétrico de 10ml. Ista utilizada como Solução estoque = 0,002g do extrato em 10 ml de Metanol espectroscópico= 200 $\mu\text{l}/\text{mL}$.
2. Identificado seis FA com as concentrações: 200, 150, 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{l}/\text{ml}$. Reservado cinco balões volumétricos de 5ml.
3. Com pipeta de 5ml, coletado 0,375L da solubilização estoque. Adicionado metanol até o menisco dos 5 ml do Balão volumétrico. Despejado no FA = 150 $\mu\text{l}/\text{ml}$.
4. Sucessivamente seguindo o protocolo de concentração dos extratos.

POP de Preparo do DPPH:

1. Pesado 2 mg (0,0020g) de DPPH
2. Colocado Metanol espectroscópico em frasco amola para solubilização por homogeneização, em seguida despejado no balão de 50 ml.
3. Completado o balão com Metanol espectroscópico até o menisco dos 50 ml, após passar pelo frasco ampola da solubilização afim de não deixar resíduos. Reservado 10 ml para uso imediato e colocado o balão e frasco ampola no congelador. Mantendo-os durante todo o preparo e armazenamento protegidos da luz, visto que DPPH é fotossensível.

ANEXO F - Formulário para avaliação da concentração inibitória mínima (MIC)

Placa n° _____ DATA ____ / ____ / ____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Microorganismo:

Extratos (triplicata):

Controle negativo(CN):

Controle de crescimento (CC):

Controle de esterilidade(CE):

Controle positivo(CP):

Meio de cultivo:

Temperatura da estufa:

Assinatura da preparação da placa: _____ Hora: _____

Assinatura da leitura: _____ Data: _____ Hora: _____

ANEXO G - Difusão em disco - Preparação dos discos teste com os extratos

À 50 mg do extrato bruto, adicionou-se 1 mL de MeOH ou EtOH, para obtenção de uma solução estoque de 50.000 µg/mL. Quando necessário, para facilitar a solubilização, a mistura foi colocada em sonicador (estufa à vapor com ultra-som). Discos de papel de filtro Whatman nº 1 de 6 mm foram confeccionados com auxílio de perfurador de papel e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min. Posteriormente, os discos foram colocados um a um, com auxílio de uma pinça estéril, em placas de poliestireno com 96 orifícios. Adicionou-se em cada poço 20 µL da solução estoque em triplicata (1000 µg/mL). Os discos foram mantidos na capela de fluxo laminar e, após secagem, eram tampados e levados a geladeira até o momento do uso.

ANEXO H - Meios e Reagentes utilizados / Preparo dos micro-organismos

a) Brain-Heart Infusion (BHI): Utilizou-se 37g do pó dissolvido em 1 litro de água destilada. O meio era esterilizado em autoclave por 15 min. a 121 °C e posteriormente mantido em geladeira até o momento do uso. b) Ágar Müller Hinton (AMH): Este meio foi utilizado para os testes com as bactérias. Para prepará-lo utilizou-se 38 g do pó solubilizados em 1 litro de água destilada e esterilizado em autoclave por 15 min. a 121 °C. Em seguida, o meio era vertido em placas de Petri descartáveis de 90x15 mm em capela de fluxo laminar, onde permanecia por 24 horas para verificação da esterilidade. Após esse período as placas eram identificadas e guardadas em geladeira para serem usadas nos ensaios biológicos. c) Ágar Sabouroud Dextrose (ASD): Este meio foi utilizado nos testes com fungo. Em seu preparo utilizou-se 65 g do pó dissolvido em 1 litro de água destilada. Após esterilização em autoclave por 15 min. a 121 °C, o meio era depositado em placa d) Solução Salina Tamponada (SST): No preparo da SST utilizou-se 5,61 g de Cloreto de Sódio, 0,11 g de Cloreto de Potássio, 1,0 g de Fosfato de Potássio Monobásico e 2,0 g de Fosfato de Sódio Dibásico, solubilizados em 1 litro de água destilada e levados à autoclave a 121°C por 15 min. A SST era mantida em geladeira até o momento do uso. e) Solução de Sulfato de Bário da Escala de McFarland: Foram utilizadas soluções padrões de turbidez, conhecida como Escala de McFarland (Figura 11, p 40), para padronização do inóculo dos micro-organismos nos testes in vitro. Esta escala foi preparada utilizando-se 10 tubos de ensaio com tampa rosqueável, os quais receberam quantidades sequenciais de solução de Sulfato de Bário ($BaSO_4$) a 1% (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 mL) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 1% q.s.p. 10 mL. A turbidez de cada tubo corresponde respectivamente às seguintes densidades do inóculo (Unidades Formadoras de Colônias-UFC): Nos testes utilizou-se o tubo nº 5 como referência para a densidade de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL (SILVA, 1999).

Preparo dos micro-organismos

Os micro-organismos utilizados nos ensaios foram oriundos do American Type Cell Collection (ATCC) e do (CCCD). A seleção dos micro-organismos foi baseada na dificuldade em tratar as infecções causadas pelos mesmos, em decorrência da resistência aos antimicrobianos padrões. Para ativação dos micro-organismos foram colocados 10 a 15 mL de

BHI em dois tubos de ensaio. Em cada tubo adicionava-se um disco do microorganismo, que era incubado por 24h a 35 °C para as bactérias, e durante 48h a 28 °C para o fungo. Após esse período o BHI assumia uma coloração turva, característica da presença do microorganismo ativado. Com auxílio de uma alça de platina, os inóculos eram repicados em duas placas de Petri, contendo o meio apropriado para cada microorganismo. Após incubação em estufa por 24h a 35 °C para as bactérias, e durante 48h a 28 °C para o fungo, as placas com os microorganismos estavam prontas para a realização dos bioensaios.

ANEXO I - Declaração de reconhecimento e catalogação da espécie vegetal – IMA



INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE ALAGOAS - IMA
HERBÁRIO MAC

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que a amostra de planta de Cristiane do Nascimento Tavares Figueira, aluna da Universidade Federal de Alagoas, coletada em Marechal Deodoro no dia 04/04/2012 e depositada no Herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas, trata-se de:

Registro MAC	Família	Espécie
55997	Areaceae	<i>Cocos nucifera</i> L.

Maceió, 23 de julho de 2012.

Rosângela P. Lyra Lemos
Curadora do Herbário MAC
IMA-AL

Rosângela Pereira de Lyra Lemos

Rosângela Pereira de Lyra Lemos
Curadora do Herbário MAC