

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
ESCOLA DE ENFERMAGEM – EENF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM/PPGENF
MESTRADO

JORGE ANDRÉS GARCÍA SUÁREZ

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DE EXTRATO
ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *Encholirium spectabile* Mart. ex Shult. & Shult. f.
(Macambira da flecha).

MACEIÓ, 2020

JORGE ANDRÉS GARCÍA SUÁREZ

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DE
EXTRATO
ETANÓLICO E SUAS FRAÇÕES DE *Encholirium spectabile* Mart. ex Shult. &
Shult. f. (Macambira da flecha).

Dissertação apresentada ao Programa Pós-graduação em Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção de Mestre em Enfermagem.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Célia Sales Santos Veríssimo.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lysete de Assis Bastos.

Área de concentração: Enfermagem no cuidado em saúde e promoção na vida.

Linha de pesquisa: Enfermagem, Ciência, tecnologia e inovação para o cuidado.

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

G216a García Suárez, Jorge Andrés.

Atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica de extrato etanólico e suas frações de *Encholirium spectabile* Mart. ex Shult. & Shult. f. (Macambira da flecha) / Jorge Andrés García Suárez. - 2020.
70 f. : il. color.

Orientadora: Regina Célia Sales Santos Veríssimo.

Co-orientadora: Maria Lysete de Assis Bastos.

Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Alagoas.
Escola de Enfermagem. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 62-70.

1. *Encholirium spectabile*. 2. Anti-infecciosos. 3. Antioxidantes. 4. Antitoxinas. I.
Título.

CDU: 615.2:582.564

Folha de Aprovação

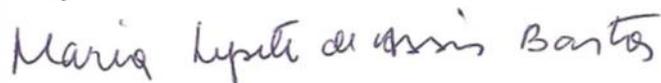
AUTOR: JORGE ANDRÉS GARCÍA SUÁREZ

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DE
EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *Encholirium spectabile* Mart. ex
Shult. & Shult. f. (Macambira da flecha).

Dissertação submetida ao corpo docente do
Programa de Pós-Graduação em Educação
Brasileira da Universidade Federal de Alagoas e
aprovada em 31 de março de 2020.

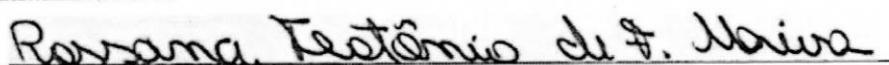


Dr.^a Regina Célia Sales Santos Veríssimo (Orientadora)



Dr. Maria Lysete Bastos de Assis (Co-orientadora)

Banca Examinadora:



Dr.^a Rossana Teotônio Farias de Moreira, Universidade Federal de Alagoas
(Examinador Externo)



Dr.^a Valter Alvino, Universidade Federal de Alagoas (Examinador Externo)

*Ao meu pai, Jorge Alfredo García
Fontalvo, por ter me dado o amor,
confiança e apoio para chegar até
aquí.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por te me mostrado o caminho e dado a força para fazer realidade esse sonho.

Ao meu pai, por ter me dado o amor, confiança e apoio para chegar até aqui. À minha mãe por nunca desistir dos seus filhos.

À minha irmã, Giovanna Michelle, pelo amor, paciência e ajuda incondicional nos momentos mais difíceis deste caminho. Love you cosita!.

Ao meu irmão Daniel García, por ser meu exemplo. Love you hermanito!

Aos meus avós Salvador Suárez, Agripina Arenas e Maritza Fontalvo, pelo apoio incondicional.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Regina Célia Sales Santos Veríssimo, por ter me dado a oportunidade de conhecer o maravilhoso mundo da pesquisa experimental! E fazer parte da construção deste trabalho.

À minha co-orientadora Maria Lysete de Assis Bastos, por ter me acolhido, ensinado e construído este mestrado junto comigo.

À Prof.^a Dra.^a Rossana Teotônio de Farias Moreira, por seu carinho e apoio incondicional.

À Prof.^a Dra.^a Adriana Reis Todaro, por ter me acolhido, aconselhado e se tornado minha segunda mãe no Brasil.

Ao meu grande amigo Yeison David Gallo, por ter me apoiado, aconselhado, suportado e ajudado na construção deste trabalho. Não tenho palavras suficientes para te agradecer por esse anos de amizade!

Ao meu grande amigo, Jose Hervey Bernal. Este sonho começou há cinco anos quando você confiou e me ajudou no momento que mais precisei.

Aos meus grandes amigos Juan Camilo Martínez e Zuleima Parody e Emerson Pereira pelas “trasnochadas” e sorrisos da sempre.

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas (LpTF), Uriel Morais, Juliana Almerino e especialmente, Rodrigo Nunes Calumby. O apoio, carinho, e amizade de vocês fizeram as tardes mais amenas no LPTF.

À Tereza Layla Lopes, pelos sorrisos, paciência, carinho e companhia.

Às minhas amigas, Vivian Barbosa e Jéssica Rocha por ter a oportunidade de compartilhar com vocês os melhores sorrisos!

Aos meus amigos de café, Teresa, Maria Julia, Leonardo e Rafael, pela sorte de ter conhecido pessoas tão maravilhosas.

Aos pesquisadores colaboradores dos laboratórios de Química Medicinal, especialmente, Érica e Paulo.

Aos funcionários do Herbário do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas, na pessoa da curadora Rosangela Lyra, pela identificação botânica.

À Organização de Estados Americanos (OEA), pela concessão da bolsa de estudos.

Mi misión ha comenzado, y tu Melquisedec, eres parte del pueblo que habré de consolar. Por tanto, ya es tiempo justo de escuchar acerca de ti, pues tu trabajo está por terminar y todo lo que proceda de tu presencia habrá de conducirme en el camino correcto.

Fragmento de: El hijo del rey, tratado para un buen gobierno.

García, J.

RESUMO

Encholirium spectabile (Macambira da flecha) é uma espécie vegetal, principalmente, utilizada por comunidades de escassos recursos socioeconômicos da Caatinga brasileira como fonte nutricional, alimentícia e para o tratamento de doenças. O objetivo desta pesquisa foi determinar o potencial antimicrobiano, cicatrizante e citotóxico de extratos etanólicos da folha, espinho, casca e raiz e de suas frações, da espécie vegetal *E. spectabile*. A planta foi coletada no município de Olho D'água do Casado, em Alagoas. Folhas, espinhos, casca e raiz foram cortadas, separadas e submetidas ao método de maceração em frio para a produção de extratos etanólicos. Posteriormente, foi realizado o fracionamento e análises fitoquímica dos extratos obtidos. Obtidas as frações, realizou-se o teste de Microdiluição em Caldo para determinação da concentração inibitória mínima. Testaram-se cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella flexneri*. A partir dos resultados foram escolhidas as frações com as melhores concentrações inibitórias e realizados ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* para determinação do potencial biológico desta espécie. A identificação do potencial antioxidante foi realizada a partir do método de seqüestro de radicais livres e a avaliação do potencial antioxidante foi realizada por meio do ensaio de toxicidade aguda de *Artemia salina* sp. O teste de microdiluição em caldo demonstrou alta e moderada atividade inibitória contra cepas Gram positivas para as frações FA da raiz 31 µg/mL e FH da casca 125 µg/mL. Já as frações FA da folha 250 µg/mL e FMf 500 µg/mL, moderada e baixa atividade antimicrobiana, respectivamente. As análises fitoquímicas mostraram a presença de duas principais famílias metabólicas: compostos fenólicos e terpenóides. O método de seqüestro de radicais livres evidenciou porcentagens superiores a 80% quando testada a FHc em concentrações a partir dos 30 µg/mL, 40 µg/mL e 50 µg/mL e porcentagens superiores a 80% e muito próximos de 90% quando testada a FA da raiz nas concentrações de 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL e 50 µg/mL. No ensaio de toxicidade aguda, de *A. salina* utilizando as FA e FM da Folha, FH da casca e FA da raiz nas concentrações de 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL e 250 µg/mL comprovou-se que as amostras não foram tóxicas.

Palavras-chave: *Encholirium spectabile*, Atividade antimicrobiana, Atividade antioxidante, Atividade citotóxica.

ABSTRACT

Encholirium spectabile (Macambira da flecha) is a plant species mainly used by communities of scarce socioeconomic resources in the Brazilian Caatinga as a nutritional, food source and for the treatment of diseases. The objective of this research was to determine the antimicrobial, healing and cytotoxic potential of ethanolic extracts from the leaf, thorn, bark and root and their fractions, of the *E. spectabile* plant species. The plant was collected in the municipality of Olho D'água do Casado, in Alagoas. Leaves, thorns, bark and roots were cut, separated and subjected to the cold maceration method to produce ethanol extracts. Subsequently, fractionation and phytochemical analysis of the obtained extracts were carried out. Once the fractions were obtained, the Broth Microdilution test was performed to determine the minimum inhibitory concentration. Strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* were tested. From the results, fractions with the best inhibitory concentrations were chosen and biological tests *in vitro* and *in vivo* were performed to determine the biological potential of this species. The identification of the antioxidant potential was carried out using the free radical scavenging method and the evaluation of the antioxidant potential was carried out by means of the acute toxicity test of *Artemia salina* sp. The broth microdilution test demonstrated high and moderate inhibitory activity against Gram positive strains for the FA fractions 31 µg / mL and FH 125 µg/mL. The FA fractions 250 µg/mL and FM 500 µg/mL, with moderate and low antimicrobial activity, respectively. Phytochemical analyzes showed the presence of two main metabolic families: phenolic and terpenoid compounds. The free radical scavenging method showed percentages greater than 80% when testing FH in concentrations from 30 µg/mL, 40 µg/mL and 50 µg/mL and percentages greater than 80% and very close to 90% when tested on FA in concentrations of 20 µg/mL, 30 µg / mL, 40 µg / mL and 50 µg/mL. In the acute toxicity test, of *A. salina* using FA, FM, FH and FA in the concentrations of 2000 µg/mL, 1000 µ / mL, 500 µg/mL and 250 µg/mL it was proved that the samples were not toxic.

Keywords: *Encholirium spectabile*, Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Cytotoxic activity.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Encholirium spectabile</i>	17
Figura 2 - Fases de preparação do extrato etanólico.....	30
Figura 3 - Fases de preparação e fracionamento dos extratos etanólicos.....	31
Figura 4 - Percentual de rendimento do extrato e as frações.....	39
Figura 5 - Espectro de absorção na região do infravermelho e as principais bandas e estiramentos da FM da folha.....	43
Figura 6 - Espectro de absorção na região do infravermelho e as principais bandas e estiramentos da FA da folha.....	44
Figura 7 - Espectro de absorção na região do infravermelho e as principais bandas e estiramentos da FH da casca.....	45
Figura 8 - Espectro de absorção na região do infravermelho e as principais bandas e estiramentos da FA da raiz.....	46
Figura 9 - % atividade antioxidante FM da folha.....	48
Figura 10 - % atividade antioxidante FA da folha.....	49
Figura 11 - % atividade antioxidante FH da casca.....	50
Figura 12 - % atividade antioxidante FA da raiz.....	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Fatores influenciadores na produção de metabólitos secundários.....	27
Tabela 2 - Avaliação da menor concentração inibitória do crescimento microbiano (MIC) dos extratos etanólicos da folha. Espinho, casca e raiz.....	43
Tabela 3 - Avaliação da menor concentração inibitória do crescimento microbiano (MIC) dos frações obtidas do fracionamento dos extratos etanólicos.....	43
Tabela 4 - Análises fitoquímica qualitativa da FM e FA da folha, FH da casca e FA da raiz.....	45
Tabela 5 - Atividade sequestradora do radical livre DPPH de frações de folha, casca e raiz de <i>Encholirium spectabile</i>	47
Tabela 6 - Concentração letal em % das frações testadas.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MS	Ministério da Saúde
CAM	Metabolismo do ácido das crassuláceas
Cm	Centímetros
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
mL	Mililitros
Kg	Kilogramas
Mg	Miligramas
G	Gramas
Eef	Extrato etanólico da folha
Eee	Extrato etanólico do espinho
Eec	Extrato etanólico da casca
Eer	Extrato etanólico da raiz
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
TTC	Cloruro 2,3,5 Trifenil Tetrazolium
Nm	Nanômetros
IMA	Instituto do Meio Ambiente de Alagoas
DMSO	Dimetilsulfóxido
Rpm	Rotações por minuto
FM	Fração metanólica
FH	Fração hexânica
FC	Fração clorofórmica
FA	Fração acetato de etila
°C	Graus centígrados
µg	Micrograma
µl	Microlitros
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima

UFC Unidades Formadoras de Colônias

MH Muller Hington

RMN Ressonância Magnética Nuclear

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 <i>Encholirium spectabile</i>	16
2.2 Bromeliaceae	19
2.3 Atividade antimicrobiana	21
2.4 Metabólitos secundários.....	23
2.5 Atividade antioxidante	24
2.6 Atividade citotóxica.....	26
2.6.1 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Artemia</i> sp (crustacea, brachiopoda)	26
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. METODOLOGIA.....	29
4.1 Tipo de estudo	29
4.2 Locais dos experimentos.....	29
4.3 Coleta e identificação do material vegetal.....	29
4.4 Preparação do Extrato Etanólico.....	29
4.5 Prospecção fitoquímica	33
4.5.1 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides	33
4.5.2 Teste para leucocianidinas, catequinas e flavononas	33
4.5.3 Teste para flavonois, flavononas, flavononois e xantonas	33
4.5.4 Testes para esteroides e triterpenos (Lieberman-Burchard)	33
4.5.5 Teste para saponinas.....	34
4.5.6 Teste para fenois e taninos	34
4.5.7 Teste para alcalóides	34
4.5.8 Teste para antraquinona, quinonas e cumarinas	35
4.6 Ensaios biológicos in vitro	35
4.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	35
4.6.2 Análise do potencial antioxidante através do método de sequestro de radicais livres DPPH.....	36
4.6.2.1 Preparação do DPPH.....	37
4.6.2.2 Preparação do extrato.....	37
4.6.2.3 Leitura das medidas da absorbância das amostras	37
4.7.1 Preparação das amostras e ensaio de letalidade	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Rendimentos dos extratos etanólicos e as frações.	39
5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos.....	40
5.2.1 Concentração inibitória mínima (CIM)	40

5.3	Análise Fitoquímica	41
5.3.1	Caracterização fitoquímica qualitativa	42
5.3.4	Espectroscopia de absorção infravermelha	42
5.4.	Atividade Antioxidante	47
5.4.1	Avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH	47
5.5	Avaliação do potencial citotóxico	50
7	CONCLUSÃO	60
8	PERSPECTIVAS	61
9	REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais e suas indicações terapêuticas é considerado uma prática antiga ainda vigente, que se relaciona a influências sociais, culturais e históricas constituindo uma das principais atividades de atenção em saúde, especialmente, em países em via de desenvolvimento (GONÇALVES et al., 2018).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde/OMS (2013), entre 65 e 80% dos países em via de desenvolvimento, dependem e utilizam plantas medicinais como alternativa terapêutica, porém, só uma porcentagem minoritária destas espécies tem sido estudada com fins científicos, sendo necessário comprovar características biológicas como seus constituintes metabólicos (JUVIK et al., 2017) e toxicidade (SILVA et al., 2017), (ALONSO et al., 2017), talentos atribuídos empiricamente e que precisam ser avaliados para certificar sua qualidade, segurança e eficácia (EKOR, 2014).

Estudos etnofarmacológicos realizados principalmente por países como Brasil, Alemanha, China, Reino Unido, Estados Unidos, entre outros, comprovaram que produtos derivados do metabolismo secundários das plantas possuem relevantes propriedades biotecnológicas, as quais têm despertado o interesse da indústria farmacêutica para o aproveitamento destes recursos (ESPINOZA, 2017).

Moléculas naturais tem sido a base do surgimento de novos fármacos e também, a descoberta de novas ações terapêuticas. O paclitaxel é um fármaco antitumoral obtido a partir do caule do *Taxus Brevifolia*. Outros medicamentos amplamente conhecidos são a digoxina (*Digitalis spp*), Morfina (*Papaver somniferum*), aspirina (*Salix sp.*) e atropina (*Atropa belladonna*) (LEONTI et al., 2017).

O surgimento de novas tendências ideológicas, a recorrência de efeitos adversos dos fármacos sintéticos, o desenvolvimento de novas tecnologias, o aumento de recursos destinados à promoção da pesquisa e desenvolvimento de novos produtos são provavelmente os fatores que poderiam explicar os interesses que o Brasil, e o mundo em plena era do conhecimento moderno, têm em explorar esse mercado (ARSHAD., et al

2014).

O estudo de plantas com potencial medicinal tem despertado grande interesse entre pesquisadores de diferentes disciplinas como a agricultura, biologia, farmacologia, enfermagem, medicina, nutrição, situação que promove a multidisciplinaridade entre áreas, até mesmo, da enfermagem, que gradativamente vem ganhando espaço dentro da pesquisa experimental e simultaneamente propondo novas alternativas para o aproveitamento destes recursos (ALVES, 2004).

O governo brasileiro tem incentivado o uso de espécies com potencial medicinal como estratégia para promover o aproveitamento de seus recursos florestais e com o intuito de garantir e melhorar o acesso aos serviços de saúde. Uma das estratégias aprovadas foi a instauração da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema único de Saúde (BRASIL, 2006).

Com a inclusão desta política, deu-se início a implantação de diretrizes que normalizaram o uso de terapias alternativas na atenção básica, entre elas, o uso de plantas com potencial medicinal com fins terapêuticos (BRASIL, 2006).

A presença de diferentes biomas: Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pantanal e Pampa, faz com que o Brasil seja reconhecido como o país mais biodiverso do mundo e, portanto, guarda a maior número de espécies vegetais do planeta (ZENNI, 2015). Algumas destas espécies já têm sido reconhecidas para o tratamento de doenças gastrointestinais (*Echinodorus grandiflorus*, *Myracrodruon urundeuva* Allemã, *Syagrus romanzoffiana*), genitourinárias (*Aristolochia triangularis*, *Achyrocline satureioides*), respiratórias (Bromeliaceae), cardiovasculares (*Equisetum hyemale* L), entre outras (BOLSON., et al 2015).

Com o intuito de promover o uso responsável e consciente de espécies vegetais para fins terapêuticos, o presente estudo propõe identificar a atividade antimicrobiana, antioxidante e o potencial citotóxico da espécie *Encholirium spectabile*. Deste modo, foi formulada a seguinte questão norteadora: A espécie vegetal *Encholirium spectabile* apresenta atividade antimicrobiana, antioxidante e potencial citotóxico?

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Encholirium spectabile*

Encholirium spectabile também conhecida como macambira ou macambira da flecha, constitui a espécie de maior plasticidade fenotípica e morfológica e de distribuição geográfica do seu gênero (FORZZA, 2005). É uma espécie xerófita e saxícola endêmica da região oriental do Brasil (RICARDO et al., 2018).

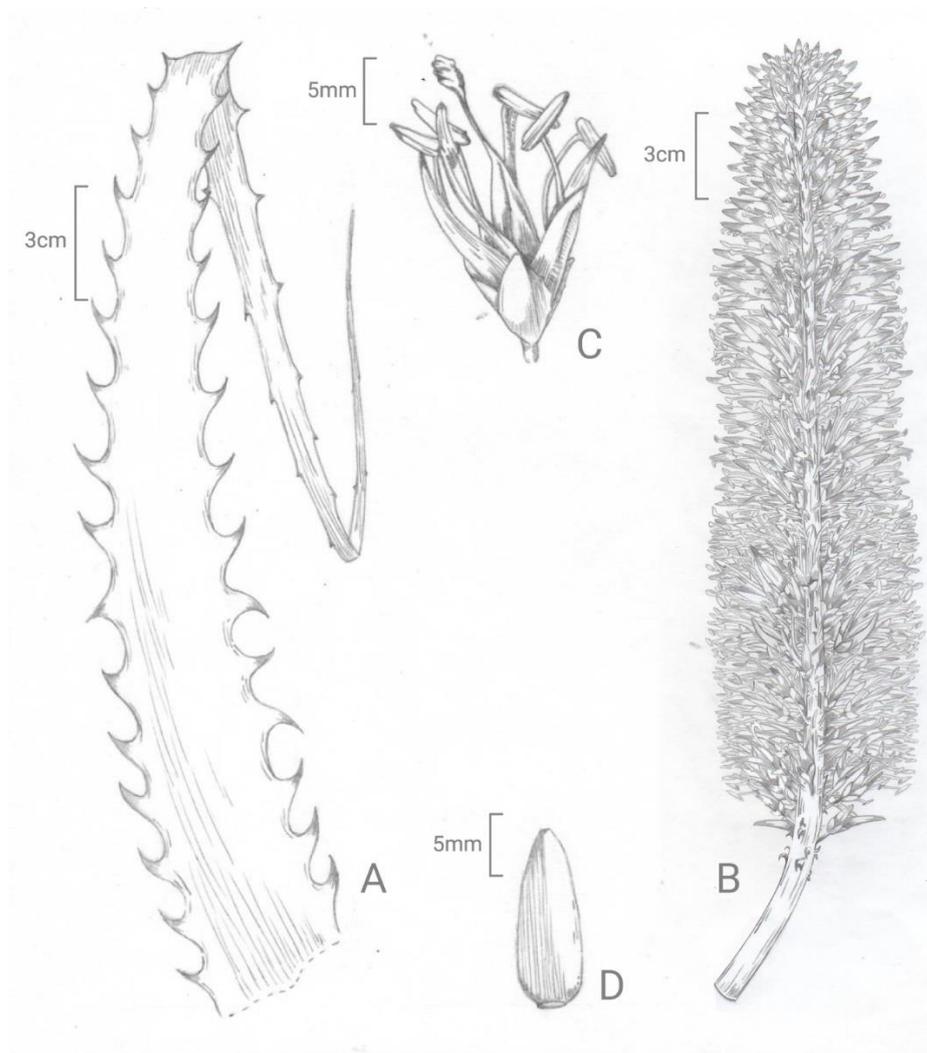
Ocorre invariavelmente em solos ricos em sedimentos clastocarbonáticos consolidados da era mesozóica, intercalados com sedimentos silticoargilosos e calcíferos de assentamentos pedregosos e semiáridos de cadeias montanhosas e serrarias nos domínios Cerrado e Caatinga (Figura 1), onde apenas espécies altamente adaptadas a condições ambientais extremas podem sobreviver ao baixo fornecimento de água e altas temperaturas (GONÇALVES et al., 2017; SGB, 2014; RAMALHO et al., 2004).

Anatomicamente difere de outras espécies da mesma família por suas folhas verde-amareladas, côncavas-convexas, 25 a 84 cm de comprimento, espinhosas e de ápice apiculado e puntiforme. Uma única inflorescência de aproximadamente 0,7 a 2mm de comprimento que floresce e frutifica regularmente entre os meses de abril e setembro (Figura 1) e constitui um microhabitat para algumas espécies de insetos.

Seu caule, abundante e condensado, se encontra unido a estrutura foliar por meio das bainhas foliares, fato que levou a diferentes autores utilizar o termo acaulescente (FORZZA, 2005; RAMALHO, 2004).

Esta espécie é utilizada tradicionalmente por populações de escassos recursos socioeconômicos, especialmente da Caatinga brasileira, constituindo uma importante fonte nutricional para estas famílias. Análises nutricionais das folhas evidenciaram seu baixo teor proteico e lipídico e alto conteúdo de carboidratos, motivo pelo qual, estas são extraídas e trituradas para a preparação de farinha que é utilizada para a cocção de cuscuz (NASCIMENTO, 2012).

Figura 1 - *Encholirium spectabile*. (A) folhas; (B) inflorescência; (C) flor; (D) Pétala.



Autor: Emerson Pereira Martínez. Adaptado de Forzza (2005).

Além das suas vantagens nutricionais, *Encholirium spectabile* é valorizada por sua importância ornamental e ecológica para outras espécies nativas. Ramalho e colaboradores (2004) observaram a presença de ninhos de *Xylocopa (Monoxylocopa) abbreviata* em hastes de inflorescências desta espécie. Sua estrutura maciça e maleável são características morfológicas que a convertem esta espécie vegetal em seu principal substrato de nidificação apenas para espécies de xylocopa de porte moderado (RAMALHO, 2004).

Sistemas de polinização generalizados ou mistos em *Encholirium spectabile* mediados principalmente por pequenos vertebrados como o morcego, assim, como outros mamíferos de maior porte como a *Gambá*

albiventris e algumas aves como o colibrí. Atributos florais desta espécie como seu ciclo crepuscular-noturno, antese noturna, inflorescências com abundante produção de flores e disponibilidade de néctar durante o dia e a noite, além do alto teor de açúcares que atendem os requisitos nutricionais de diferentes polinizadores, são atributos associadas a ornitofilia e quiropterofilia, favorecendo a alta diversidade de polinizadores de diferentes espécies, qualidade não comum em outras espécies de bromélias (QUEIROZ et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

Encholirium spectabile é a espécie melhor compreendida e estudada do seu gênero, não obstante, poucos têm sido os estudos realizados sobre os aspectos fitoquímicos e farmacológicos desta espécie (JUVIK 2017). Um estudo etnobotânico liderado por Almeida e colaboradores (2010) identificou as principais plantas nativas e exóticas com potencial medicinal, conhecidas e utilizadas pelas comunidades rurais do estado de Paraíba, Brasil, destacando-se 108 espécies pertencentes às famílias Euphorbiaceae, Lamiaceae, Caesalpiniaceae, Mimosaceae, Solanaceae e Bromeliaceae. Desta última, *Encholirium spectabile* foi reconhecida por membros da comunidade de Barrocas como uma das espécies mais utilizadas para o tratamento de doenças.

Saraiva e colaboradores. (2013) reportaram a atividade antinociceptiva de extratos etanólicos de *Encholirium spectabile* a partir de modelos animais. Em seu estudo, foi administrado 10 mL/Kg de peso de ácido acético 0,9% em camundongos previamente tratados com doses de 100, 200 e 400 mg/kg de extrato etanólico de folhas de *Encholirium spectabile*. Após observação e análises das contorções abdominais dos animais, foi determinado que este extrato possui atividade antinociceptiva periférica provavelmente associada a presença de compostos fenólicos.

Carvalho e colaboradores (2010) demonstraram o potencial antiulcerogênico de extratos etanólicos de folhas de *Encholirium spectabile*. Em seu estudo, induz úlceras gástricas em ratos utilizando substâncias corrosivas que deterioraram a mucosa gastrointestinal: álcool absoluto, ácido clorídrico/etanol e uma solução de ibuprofeno. Os resultados demonstraram que administração de doses de 100 mg/kg

protege e reduz notavelmente as lesões gástricas.

A atividade antimicrobiana desta espécie também tem sido comprovada por diferentes autores. Silva e colaboradores (2014) na sua pesquisa relataram o potencial microbicida de extratos etanólicos de folhas frente a cepas de *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp. e *Klebsiella* spp. Fernandes e colaboradores (2015) descreveram a atividade antibacteriana de extratos de folhas frente a isolados de *Escherichia coli* de suínos. Peixoto e colaboradores (2016) confirmaram essa mesma atividade contra *Staphylococcus spp* isolados de pequenos ruminantes.

Santana e colaboradores (2012) demonstraram a atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos etanólicos de folhas e suas frações. Oliveira e colaboradores (2013) comprovaram a atividade antioxidante de extratos etanólicos desta espécie através do método do DPPH. Juvik e colaboradores (2017) descreveram a presença de substâncias não polares em extratos de folhas desta espécie. Apesar de ser a espécie melhor conhecida e estudada de seu gênero, ainda são poucos os estudos realizados que permitam determinar o verdadeiro potencial medicinal e biotecnológico de *Encholirium spectabile*.

2.2 Bromeliaceae

Bromeliaceae é uma família compreendida por 58 gêneros e aproximadamente 3.172 espécies vegetais, sendo especialmente distribuídas em regiões tropicais e neotropicais (SOUSA & COLPO, 2016). Com exceção de um taxon, *Pitcairnia feliciana*, nativa do oeste africano, as espécies pertencentes a esta família habitam em zonas de meia altitude e áreas de muita precipitação e umidade (FORZA, 2005; VIEIRA et al., 2013).

Inicialmente foi descrita uma classificação taxonômica baseada em características florais e morfológicas de frutos e sementes derivada em três subfamílias principais, Bromelioideae, Pitcairnioideae Tillandsioideae. Não obstante, a partir de novos estudos taxonômicos e moleculares foram definidas oito subfamílias, Pitcairnioideae,

Bromelioideae, Tilandsioideae, Brocchinioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae e puyoideae (SANTOS et al., 2013).

Suas espécies se encontram amplamente distribuídas nos biomas brasileiros, principalmente na Mata Atlântica, abrigando mais de 70% das espécies e aproximadamente 30% de seus gêneros, podendo ser encontradas plantas epífitas, terrícolas ou rupícolas geralmente de aspecto herbáceo, que brotam em terrenos pedregosos e pouco profundos (SILVA et al., 2013). Suas espécies representam a segunda maior família de plantas epífitas no mundo, depois de *Orchidaceae* (GIVNISH et al., 2014).

Bromeliaceae é conhecida pela exuberância das suas inflorescências e flores, inclusive a própria folhagem, por sua importância ecológica, sinônimo de diversidade dentro de um mesmo ecossistema, por seu potencial ornamental bem aproveitado, fato que em algum momento propiciou o desflorestamento indiscriminado, colocando em estado de ameaça estas espécies (TODESCHINI et al., 2018; FERRARI et al., 2016). A conformação morfológica das suas folhas permite a formação de microhabitats, bases em forma de roseta que constituem pequenos reservatórios de água e nutrientes propícios para a propagação da vida de pequenos insetos, formigas e aranhas, até alguns anfíbios como algumas espécies de sapos (GIVNISH, 2007).

Ao longo dos anos, Bromeliaceae tem desenvolvido múltiplos mecanismos de adaptação que favoreceram seu processo evolutivo em diferentes ecossistemas, fato que explica a presença destas espécies nas mais variadas condições de altitude, temperatura e umidade (SILVA et al., 2016).

Epifitismo, mecanismos particulares de absorção de água e nutrientes das folhas, fotossínteses de CAM e sistemas polinizadores constituem algumas das adaptações fisiológicas e genéticas destas espécies que até hoje garantem sua existência e diversidade nas mais extremas condições ambientais (MALES, 2016; RAMIREZ & ESTRADA, 2018). Este autor também propõe vantagens ambientais que promoveram a diversificação e melhor adaptação destas espécies, entre elas, umidade, sazonalidade e índice de fertilidade dos solos (SHULTE;

HORRES; ZIZKA, 2017).

Dada a natureza epífita da maioria de suas espécies, é possível estabelecer uma associação entre esta característica e outros mecanismos adaptativos anteriormente mencionados (Zarate & Mondragon, 2016). Assim, a captação de nutrientes e minerais por espécies epífitas é favorecida pela morfologia das suas folhas, que permite a captação de água e minerais provenientes das chuvas e favorece o deslocamento e absorção destes nutrientes a outras partes da planta, como tricomas foliares ou raízes (ZANELLA et al., 2012).

Outra adaptação fisiológica apresentada por espécies pertencentes a esta família, ocorre quando plantas expostas a condições ambientais extremas, por exemplo, altas temperaturas e pouco fornecimento de água, devem recorrer a vias metabólicas alheias a fotorrespiração, evitando assim, o gasto indiscriminado de energia e água (CRAYN et al., 2015; MALES, 2018).

Esta família além de ser reconhecida por suas qualidades ornamentais e alimentícias (KRUMREICH, 2014; PRADO et al., 2014; CERON et al., 2016), destaca-se pelo potencial medicinal de suas espécies: anticoagulante (ERRASTI, et al, 2016), atividade proteolítica (HERNANDEZ et al., 2016; VALLÉS e CANTERA., 2018), antiulcerogênica (SINGH et al., 2018), antioxidante (ESPINOZA et al., 2018), hipoglicemiante (RIVERA; CETTO; VILLASEÑOR, 2019), antiinflamatória (MACEDO, 2018).

Gonçalves e colaboradores (2017) reportaram a atividade antioxidante e fotoprotetora de *Neoglaziovia variegata*. Silva e colaboradores (2018) demonstraram a atividade antiinflamatória de extratos etanólicos de *Bromelia Balansae*. Martins e colaboradores (2015) destacaram a atividade antiulcerogênica de Ananas ananassoides e menciona a atividade antirreumática e antioxidante de *Encholirium spectabile*.

2.3 Atividade antimicrobiana

A busca e estudo de plantas medicinais com atividade antimicrobiana

tem despertado particular interesse dentro da comunidade científica, especialmente, pelo crescente número de relatos relacionados com resistência antimicrobiana. Apesar das múltiplas estratégias utilizadas para mitigar essa situação, racionalização, formulação e uso consciente dos antibióticos, o uso frequente e indiscriminado destes, continua sendo uma problemática mundial que tem levado a multirresistência de microrganismos (Araujo, 2012).

Medicamentos anteriormente eficazes contra bactérias associadas à cicatrização de feridas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomona aeruginosa*, tem desenvolvido diferentes mecanismos de resistência intrínsecos e relacionados com a transmissão de material genético que dificultam o tratamento de infecções associadas aos mesmos (CORNAGLIA, 2009). Como consequência, nos últimos anos tem surgido casos de resistência para antibióticos de último recurso como o Linezolid (CANDEL et al., 2016).

Esta situação revela uma verdadeira crise de saúde pública que precisa ser resolvida. A organização Mundial da Saúde (2017) descreve o fenômeno de resistência antimicrobiana como uma ameaça a essência mesma da medicina moderna e saúde pública e como uma ameaça persistente das doenças infecciosas.

As consequências deste fenômeno vão além das complicações na saúde de seres humanos e animais, o impacto econômico relacionado com o aumento dos custos do tratamento encontra-se relacionado com a necessidade de novas inversões em longo prazo, apoio técnico e financeiro de outros países para o desenvolvimento de novos medicamentos, melhoramento de diagnósticos e fortalecimento dos sistemas de saúde (OMS, 2017).

Desta forma, entende-se a necessidade na busca e desenvolvimento de novas formas farmacológicas. Assim, dada à vasta biodiversidade brasileira, o estudo de extratos vegetais com atividade antimicrobiana constitui uma fonte de biomoléculas pouco explorada que se apresenta como uma alternativa viável para a resolução desta problemática (CASTILHO et al., 2012).

O interesse na caracterização e isolamento de novos compostos não é exclusivo do descobrimento de novas formas farmacológicas, e sim, surge da preocupação da sociedade atual de reemplazar os produtos sintéticos e aproveitar os recursos e moléculas naturais previstas pela natureza. Assim, as

plantas com potencial medicinal, especialmente com atividade antimicrobiana, representam um mercado natural que aumenta a confiabilidade dos usuários para o consumo de fitoterápicos (SHAN et al., 2007).

2.4 Metabólitos secundários

Organismos como plantas, insetos, algas marinhas e microrganismos encontram-se em contínua interação com o meio ambiente, como consequência, apresentam um metabolismo diferenciado capaz de produzir e acumular outras substâncias relacionadas na sua maioria com mecanismos de defesa contra predadores, estados de injúria ou comunicação entre espécies (SANTOS, 2002).

Apesar de não serem considerados necessários para o completo desenvolvimento e vida em plantas, e anteriormente serem considerados produtos de excreção, sua produção está justificada como uma importante ferramenta evolutiva para a proteção contra herbívoros, ataque de microrganismos, atração de polinizadores, competência pela obtenção de nutrientes frente a outros vegetais, suporte estrutural e pigmentos e outras vantagens físicas como a proteção contra fatores externos como temperatura e exposição ultravioleta (MAKKAR, 2007; PERES, 2011).

Essas biomoléculas são conhecidas pelo nome de metabólitos secundários e encontram-se distribuídas nas diferentes estruturas vegetais. Sua função está relacionada a sua estrutura e composição química. A biossíntese e expressão de metabólitos secundários difere para cada espécie, inclusive, para taxones de uma mesma espécie, podendo-se encontrar diferentes classes metabólicas para espécies pertencentes a uma mesma família, por isto, em ocasiões são utilizados como marcadores de identificação quimiotaxonômicos (SANTOS, 2002).

A taxa de biossíntese e acumulação destes estão influenciadas pela carga e expressão genética de cada espécie, por processos fisiológicos e fatores ambientais. Assim, variações nas características e concentrações destas biomoléculas relaciona-se a variáveis ambientais como temperatura, umidade, sazonalidade, radiação UV, entre outras. Na maioria dos casos é correto destacar que alterações na quantidade ou sínteses de um determinado

grupo metabólico está associado a complexas interações entre os fatores supracitados (LOPES & NETO, 2007).

Quadro – 1 Fatores influenciadores na produção de metabólitos secundários

Fatores influenciadores na produção de metabólitos secundários.
Fatores fisiológicos: estadio de desenvolvimento, ciclo de atividade do polinizador, estímulos mecânicos ou químicos, parte utilizada, rendimento do extrato.
Fatores ambientais: variações anuais, mensais, horárias, índice pluviométrico, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, sazonalidade.

Fonte: LOPES & NETO (2007).

Apesar de não fazer parte do metabolismo primário, as vias de sínteses de metabólitos secundários se originam das primárias. Deste modo, são conhecidos cinco grupos principais, com base na sua origem biossintética: compostos nitrogenados ou alcaloides, compostos fenólicos e terpenóides, esteróides e policetídeos (Figura 2) (Simões et al., 2002).

A importância de obter moléculas naturais derivadas do metabolismo secundário das plantas sem ter modificações bioquímicas a partir dos processos associados a sua obtenção está na possibilidade de encontrar novas substâncias com atividades terapêuticas em seres humanos. Deste modo, inúmeras pesquisas têm se direcionado na busca, caracterização e isolamento dos diferentes grupos metabólicos com atividades biológicas de interesse medicinal e farmacológico.

2.5 Atividade antioxidante

Radicais livres são moléculas que possuem um elétron não pareado na sua órbita externa, como consequência e dada sua alta reatividade, tendem procurar sua estabilidade química a partir da oxidação de outras moléculas (SILVA et al., 2010). Sua formação no organismo é produto de processos metabólicos celulares, entre eles, a cadeia respiratória mitocondrial ou a cadeia transportadora de elétrons, além da formação exógena pela exposição a fatores externos como o consumo de cigarros e alguns medicamentos

(paracetamol, tetracloreto de carbono ou furosemida), ou exposição a radiação ultravioleta (SILVA, 2009).

Sua relevância fisiológica está relacionada principalmente na síntese de espécies reativas de oxigênio como parte da resposta imunológica (fagocitose e quimiotaxis), sínteses de ATP, crescimento celular e favorecimento na produção de outras moléculas como colágeno e prostaglandinas (SILVA, 2009). Não obstante, dada sua alta reatividade e instabilidade, a presença de radicais livres se encontra associada com danos oxidativos como a peroxidação lipídica em membranas celulares ou desnaturalização de proteínas e DNA, explicando sua relação com o aparecimento de doenças neurodegenerativas (alzheimer), cardiovasculares (ateroesclerose), osteomusculares (artrite), entre outras (SILVA, 2010).

Agentes antioxidantes sintéticos como o butil hidroxitolueno (BHT), Butil hidroxianisol (BHA) e terc-butil hidroquinona (TBHQ) têm sido utilizados com frequência como aditivo na indústria alimentícia por seu baixo custo e alta eficácia. Entretanto, seu consumo está relacionado com efeitos tóxicos e cancerígenos em seres humanos (DEGASPARI, 2004). Assim, o uso de antioxidantes naturais constitui uma necessidade frente a essa problemática. Dentre estes, tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos vegetais são os mais conhecidos (RAMALHO, 2006).

Extratos de origem vegetal são amplamente referenciados por seu alto teor de metabólitos secundários, moléculas biológicas reconhecidas por amplo potencial biológico (LOPES & NETO, 2007). Dentre este grupo, os compostos fenólicos constituem a família metabólica mais importante quando relacionada a capacidade de redução de formação de radicais livres e quelação de metais como o íon ferro (ACKER et al., 1996; DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos como os flavonoides se relaciona à eficácia na prevenção da peroxidação lipídica da membrana através do aprisionamento de radicais relacionados com esse processo (HAVSTEEN, 2002; DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

Diferentes métodos têm sido empregados para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais, entre eles, o método de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) é um dos mais utilizados dado seu baixo custo, simplicidade e rapidez de reação (BRAND-WILLIAMS et al.,

1995).

O 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) é um radical de nitrogênio orgânico, de coloração violeta, altamente estável a temperatura ambiente, que apresenta um elétron não pareado, que perde gradualmente sua cor, uma vez reduzido por um agente antioxidante a partir da transferência de um íon H (MOLYNEUX, 2004).

O teste de sequestro do radical livre DPPH baseia-se numa reação de oxido-redução, onde o radical não pareado do nitrogênio se emparelha com um elétron cedido por um radical hidrogênio de um agente antioxidante. Como resultado, o radical DPPH inicialmente violeta passa a tomar uma coloração amarelada pálida com conseqüente diminuição da absorbância da solução na região de comprimento de onda de 515 nm (SOUSA et al., 2007).

2.6 Atividade citotóxica

2.6.1 Ensaio de toxicidade aguda com *Artemia* sp (crustacea, brachiopoda)

Artemia salina é um microcrustáceo pertencente à classe Branchiopoda. São organismos de aproximadamente 8-10 milímetros de comprimento e representam uma importante fonte nutricional para peixes e outros crustáceos em seu ambiente natural, motivo pelo qual se encontra plenamente adaptado a condições de altas temperaturas (40°), salinidade e pouca oxigenação. Seu ciclo reprodutivo é rápido e seus cistos podem ser preservados por aproximadamente 10 anos quando conservados em condições ambientais adequadas, e aptas para eclodir após 24 horas quando colocados em água salina (NASCIMENTO et al., 2008).

Dada sua marcada sensibilidade, reduzido grau de tolerância a determinados fatores ambientais, características fisiológicas como fácil reprodutibilidade, possibilidade de stock de grande número de material biológico representado por seus cistos, fácil aquisição, manipulação e baixo custo, este microcrustáceo é amplamente utilizado para a realização de ensaios de toxicidade (BORTOLOTTI, 2007).

O ensaio de toxicidade aguda de *Artemia salina* é realizado como teste

inicial para avaliar a atividade citotóxica principalmente de extratos vegetais ou substâncias puras. Este bioensaio representa uma alternativa de proteção e conservação de espécies animais de pequeno e grande porte, utilizadas tradicionalmente na pesquisa experimental para a avaliação da atividade biológica de compostos naturais de promissora atividade biológica (NASCIMENTO et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica de extrato etanólico e suas frações de *Encholirium spectabile* Mart. ex Shult. & Shult. f. (Macambia da flecha).

3.2 Objetivos específicos

- Identificar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato etanólico e suas frações utilizando cepas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e cepas Gram negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* e *Shigella flexneri*.
- Realizar a prospecção fitoquímica qualitativa e análises espectroscópico IV das frações metanólica e acetato de etila da folha, hexânica da casca e acetato de etila da raiz;
- Verificar a atividade citotóxica *in vitro* das frações metanólica e acetato de etila da folha, hexânica da casca e acetato de etila da raiz através do ensaio de toxicidade aguda-Método de ensaio com *Artemia sp (crustacea, brachiopoda)*;
- Analisar a atividade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres DPPH.

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo de abordagem quantitativo, de desenho experimental, no qual foram avaliadas as propriedades antimicrobiana, antioxidante e citotóxica de extrato etanólico e suas frações das folhas, espinhos, cascas e raiz a partir da coleta e testes laboratoriais da espécie vegetal *Encholirium spectabile*. Para a realização deste estudo foram realizados os seguintes testes: método de microdiluição em caldo para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CLSI, 2012), método de sequestro de radicais livres para avaliação do potencial antioxidante e ensaio de toxicidade aguda através do método de ensaio com *Artemia sp* para determinar o potencial citotóxico dos extratos analisados (ABNT, 2016).

4.2 Locais dos experimentos

Foram realizados testes no Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas da Escola de Enfermagem – LPTF/EENF, no Laboratório de Química Medicinal do Instituto de Ciências Farmacêuticas - LQM/ICF, no Laboratório de Eletroquímica Aplicada do Instituto de Química e Biotecnologia – LEap/IQB, e no Laboratório de Análises Farmacêuticas e Alimentícias do Instituto de Ciências Farmacêuticas - LAFA/ICF, todos pertencentes a Universidade Federal de Alagoas.

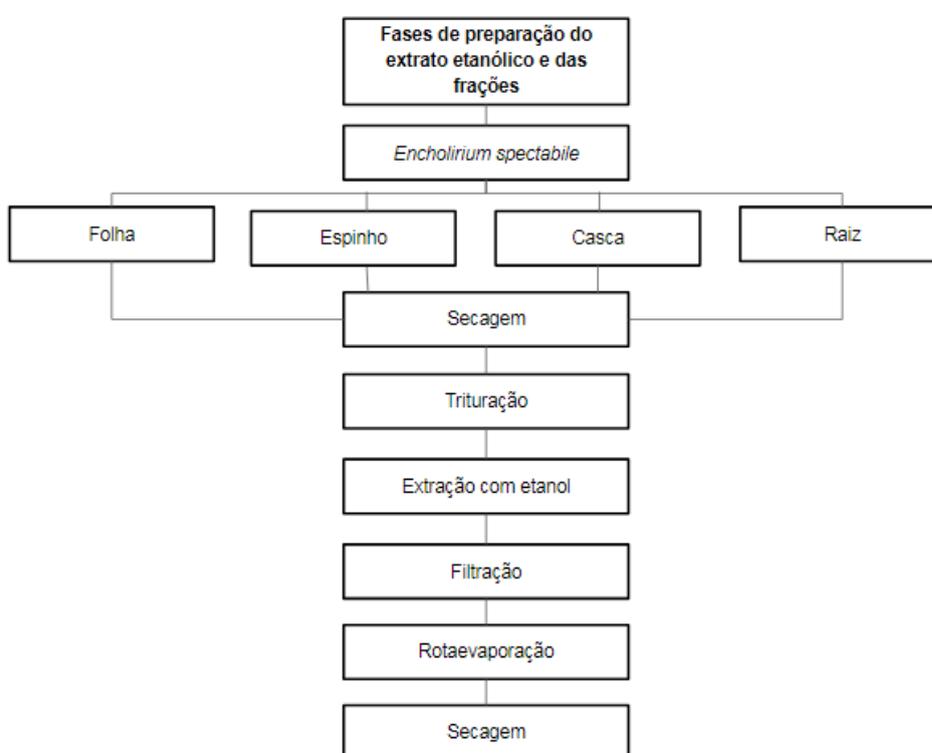
4.3 Coleta e identificação do material vegetal

A coleta foi realizada no estado de Alagoas, no Município de Olho d'Água do Casado, localizado na mesorregião do Sertão alagoano, com as coordenadas 09°32'10" sul e a uma longitude 37°17'38" oeste. As amostras da planta foram identificadas pelo Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas (IMA), as exsiccatas encontram-se catalogadas no herbário do IMA com n° de registro MAC 64936.

4.4 Preparação do Extrato Etanólico

A espécie utilizada foi seccionada, separada em cada uma de suas partes, folhas, espinhos, casca e raiz, distribuídas em recipientes diferentes e secas em estufa de circulação de ar a 40°C por um período de 7 dias até desidratar as amostras. Imediatamente, cada uma das peças foi triturada individualmente com moinho de corte. O produto final deste processo foi pesado em balança semianalítica.

Figura 2 - Fases de preparação do extrato etanólico.



Fonte: Próprio autor, 2019.

Após este processo, cada amostra foi armazenada em recipientes de vidro, limpos e protegidos da luz para dar início a extração das moléculas biológicas de interesse por meio da técnica de maceração em frio (Figura 3). Esta consiste na interação entre as amostras previamente preparadas e um solvente orgânico seletivo, em função da polaridade do grupo de substâncias que se pretende extrair (Simões et al., 1999).

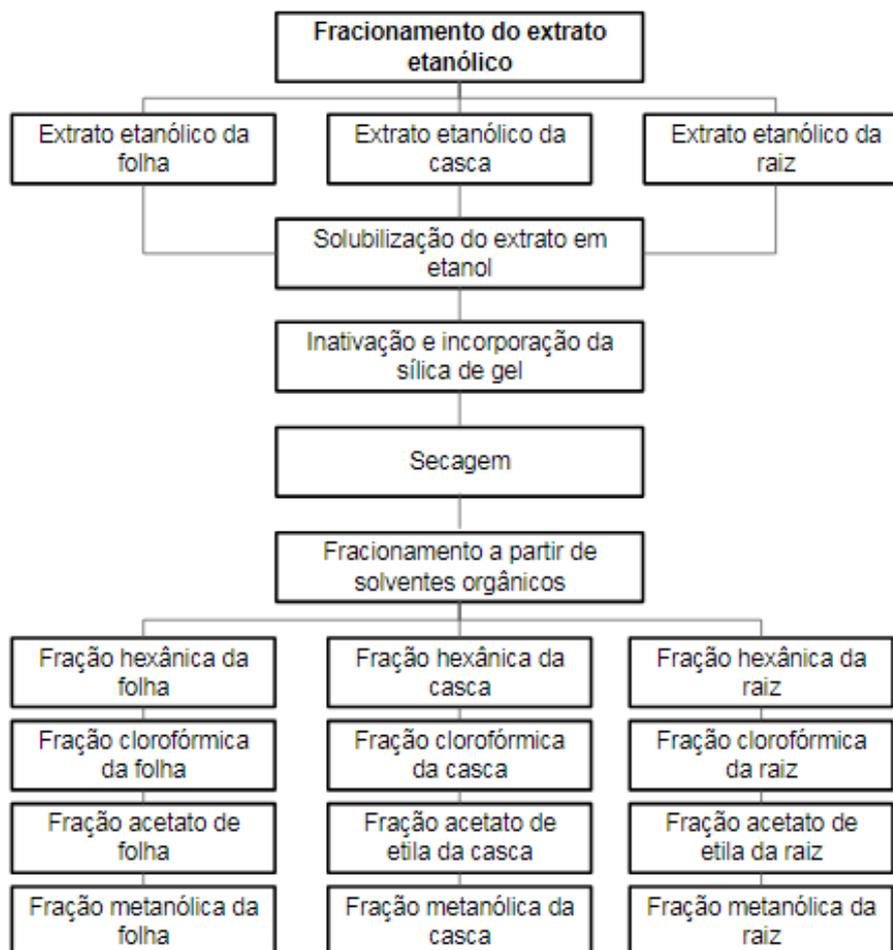
Quando se desconhece a polaridade do grupo metabólico pretendido, são comumente utilizados solventes de polaridade crescente

como o etanol, além, por sua facilidade de custos e manipulação (Simões et al., 1999). Após o primeiro contato entre o solvente e as amostras, ocorreu a filtração do produto obtido e a readição de líquido extrator dando assim, continuidade a este processo (adição de solvente e filtração). O tempo de contato entre cada processo de adição de solvente foi de 72 horas, totalizando um total de 3 ciclos. Para a realização desta pesquisa, foi utilizado etanol 99% por suas vantagens, anteriormente discutidas.

Sequencialmente, e após cada extração, o novo produto foi processado em evaporador rotativo a 80rpm e uma temperatura de 40°C. O objetivo deste processo foi eliminar os resíduos alcoólicos presentes nas amostras, finalizando assim, na obtenção do extrato bruto. Após finalizado o processo de evaporação, os extratos líquidos foram acondicionados em recipientes de vidro previamente esterilizados, não completamente lacrados e mantidos em estufa a 36 °C, até obtenção do extrato seco. Cada amostra foi pesada e armazenada em freezer a 8 °C para conservação das mesmas: Extrato etanólico da folha 15 g, extrato etanólico do espinho 2 g, extrato etanólico da casca 24 g e extrato etanólico da raiz 15 g.

Inicialmente, extrato etanólico da folha, casca e raiz foi solubilizado em 500 mL de etanol absoluto. Após esta ação, 100 g de sílica de gel para o EE da casca e 80 g para o EE da folha e EE da raiz foram inativadas adicionando 10 % do peso da mesma (10 mL) e (8 mL) de água destilada e levadas a evaporador rotativo sem pressão de ar por 30 minutos. Imediatamente, foi realizada a incorporação da sílica ao extrato diluído (Figura 4). Para isto, a mistura da nova solução foi levada à evaporador rotativo a 160 rpm. Uma vez finalizado, o produto final foi colocado em recipiente de vidro previamente esterilizado, seco, não totalmente lacrado e mantido em estufa a 36 °C por 24 até secar completamente.

Figura 3 - Fases de preparação e fracionamento dos extratos etanólicos.



Fonte: Próprio autor, 2019.

A continuação, o novo produto foi particionado em coluna filtrante sob vácuo, utilizando a mesma como fase estacionária e como fase móvel 250 mL de solventes orgânicos, hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, em ordem crescente polaridade. Através da passagem sucessiva dos solventes, foram-se obtendo novas soluções e cada uma delas foi armazenada em recipiente previamente esterilizado para separação das novas frações.

Cada fração líquida foi rotaevaporada e concentrada até obter um resíduo semisólido que posteriormente foi levado à estufa a 36 °C até eliminar os excipientes de cada solvente, resultando em três frações do extrato para cada solvente. Realizou-se o fracionamento dos extratos obtidos através da técnica de filtração em coluna de sílica, visando a

separação e posterior isolamento dos grupos metabólicos e moléculas responsáveis pelas atividades biológicas de interesse para esta pesquisa.

4.5 Prospecção fitoquímica

Para a determinação inicial dos componentes químicos presente em cada um dos extratos foi realizada a triagem fitoquímica. Esta técnica, a partir da aplicação de diferentes ensaios experimentais, que identifica qualitativamente os grupos de compostos químicos presentes em uma planta e direciona a extração ou fracionamento aos grupos de maior interesse, a partir da interpretação de reações químicas de cor ou precipitação (Matos, 1997).

4.5.1 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides

Foram preparados três tubos de ensaio para cada amostra. O primeiro tubo foi acidificado com ácido clorídrico até alcançar pH de 3,3. O segundo e o terceiro tubo foram alcalinizados com hidróxido de sódio (NaOH) até alcançar um pH de 8,5 e 11 respectivamente. As mudanças na coloração representam a presença ou ausência de compostos (Matos 1997).

4.5.2 Teste para leucocianidinas, catequinas e flavononas

Para este teste, um tubo de ensaio será acidificado com HCl e outro alcalinizado com NaOH. Os tubos foram aquecidos durante três minutos. As mudanças na coloração dos tubos serão indicativas de presença ou ausência destes grupos metabólitos (Matos 1997).

4.5.3 Teste para flavonois, flavononas, flavononois e xantonas

Em um tubo de ensaio serão adicionados Mg granulado e 0,5 mL de ácido clorhídrico. O aparecimento de coloração vermelho ou o aumento da mesma será indicativo da presença de destas substâncias (Matos 1997).

4.5.4 Testes para esteroides e triterpenos (Lieberman-Burchard)

Uma alíquota de extrato foi diluída em 2 mL de clorofórmio e filtrada em funil coberto com sulfato de sódio anidro para a retirada da água residual. Imediatamente adicionou-se 1 mL de anidro acético. Após agitação, agregou-se ácido sulfúrico concentrado. Após nova agitação foram observadas as mudanças na coloração.

O aparecimento de uma coloração azul evanescente seguida de um tom verde indicará a presença de esteroides livres. O aparecimento de uma coloração parda a vermelha foi indicativo de triterpenos pentacíclicos livres (Matos 1997).

4.5.5 Teste para saponinas

Para a realização deste, resíduo insolúvel do experimento anterior foi solubilizado em 10 mL de água destilada, filtrado e colocado em outro tubo de ensaio. O aparecimento de espuma após agitação, foi indicativo de da presença de saponinas (Matos 1997).

4.5.6 Teste para fenois e taninos

Foi preparada uma solução de extrato mais 3 gotas de cloreto de ferro. Posterior agitação foi observada a presença de alterações na solução. Coloração entre azul e vermelho foi indicador de fenois. A formação de precipitado azul escuro foi indicador da presença de taninos. A presença de precipitado verde foi indicador da presença de taninos condensados. (Matos 1997).

4.5.7 Teste para alcalóides

Após diluição, uma placa de Cromatografia em Camada delgada (CCD) foi impregnada com uma alíquota de extrato e usando 2 mL de clorofórmio como fase móvel, o cromatograma foi revelado com reagente de Dragendorff. O aparecimento de manchas de cor alaranjada sugere a presença de alcalóides. Um segundo teste, de caráter confirmatório, foi realizado após solubilizar uma alíquota de extrato em 3 gotas de uma solução de ácido clorídrico e imediatamente foram agregadas 3 gotas de reagente de Dragendorff. A formação de precipitado de cor alaranjado foi

sugestiva da presença de alcaloides (Matos 1997).

4.5.8 Teste para antraquinona, quinonas e cumarinas

Uma alíquota de extrato foi solubilizada em metanol e posteriormente uma placa cromatográfica (CCD) foi impregnada com essa solução. Como fase móvel foi utilizada uma solução de clorofórmio:metanol (9:1). Após eluição, a placa foi umedecida com hidróxido de potássio 10%. Esperou-se observar a presença de cor azul, indicativa da presença de cumarina, cor vermelha, indicativa da presença de antraquinonas ou amarela de antronas (Matos 1997).

4.5.9 Espectroscopia de absorção infravermelha

Os espectros de FT-IR foram obtidos no equipamento Espectrômetro Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR IR-Prestige-21, Shimadzu) em módulo de ATR. O intervalo investigado compreendeu 4000 a 500 cm^{-1} , com 32 varreduras, resolução de 4 cm^{-1} e detector do tipo InGaAs.

4.6 Ensaio biológicos in vitro

4.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A microdiluição em caldo é considerada o método mais sensível para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Além do anterior, este método oferece outras virtudes, tais como a fácil reprodutibilidade, requer apenas uma pequena quantidade de extrato para sua realização, além da possibilidade de testes simultâneos em um grande número de amostras (CLSI 2012). As cepas bacterianas utilizadas para a realização deste teste foram: Gram positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990) e Gram negativas *Escherichia coli* (ATCC 14942), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022).

Inicialmente foram pesados 2 mg de cada extrato e diluídos em 40 μL de DMSO 2%. Imediatamente, adicionou-se 1960 μL de soro

fisiológico para uma solução estoque de 2000 µg/2 mL. Em uma placa de 96 poços (divididas em 12 colunas, 1-12, e 8 linhas A-H), foram adicionados 100 µL de caldo Mueller-Hinton (MH). Sequencialmente, um volume de 100 µL da solução estoque foi agregado em triplicata nas colunas 1-9 da linha A, com concentração inicial de 1000 µg/mL (CLSI 2012). Seguido, 100 µL do conteúdo de cada poço da linha A foi transferido para os poços da linha B, homogeneizado, e novamente transferido para os orifícios da linha C, imitando este processo até a linha H, desprezando-se, o excesso da diluição. Finalmente, obtiveram-se concentrações decrescentes do extrato (CLSI 2012).

Previamente, foram preparados os inóculo bacterianos para as cepas descritas. Em solução salina estéril foi adicionada uma alíquota de cada cepa e a suspensão bacteriana foi preestabelecida pela escala 0,5 de Mcfarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), diluída em uma proporção de 1:10 até se obter uma solução diluição 10^7 UFC/mL, sendo a concentração final de bactérias entre 5×10^5 e 5×10^4 UFC/mL. Em cada poço foi adicionado 5 µL do inóculo bacteriano (CLSI 2012).

Os testes de controle foram efetivados nos poços 10, 11 e 12. O poço 10 foi utilizado para o controle positivo da viabilidade bacteriana. Utilizou-se 100 µL caldo de cultivo MH e 5 µL de inóculo bacteriano. O poço 11 utilizou-se para avaliar o potencial inibitório do DMSO a 2%. O poço 12 foi utilizado como controle de esterilidade semeando apenas 100 µL caldo MH. Após adicionou-se o inóculo, as placas foram incubadas em estufa bacteriostática a 35°C por 24 horas. Após este período, foram adicionados 20µL de Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC) a 5% em cada poço.

Para interpretação dos resultados foram utilizados critérios de avaliação estabelecidos pelo CLSI 2012: CIM de até 100 µg/mL é considerada ativa, CIM entre 100 µg/mL – 500 µg/mL são consideradas como atividade inibitória moderada, CIM entre 500 µg/mL – 1000 µg/mL é considerada como atividade fraca e CIM maiores que 1000 são descritas sem atividade.

4.6.2 Análise do potencial antioxidante através do método de sequestro

de radicais livres DPPH

4.6.2.1 Preparação do DPPH

Foi preparada uma solução estoque de 100 mL de DPPH na concentração de 0,004 mg/mL. Para isto, 0,004 g de DPPH foram pesados em balança analítica (Shimadzu AX 200) 0,004 g e posteriormente, solubilizados em 100 mL de etanol absoluto, com o auxílio de um balão de âmbar de 100 mL.

4.6.2.2 Preparação do extrato

Foi preparada uma solução estoque para cada extrato de 20 mg/5mL. Para isto, 20 mg da FM e FA da folha, FH da casca e FA da raiz foram solubilizadas em 5 mL de metanol. Cada amostra foi colocada em ultrassom e imediatamente filtrada com membrana milipore.

4.6.2.3 Leitura das medidas da absorbância das amostras

Em um balão de âmbar de 5 mL foi colocada uma alíquota de 50 µg/mL, 40 µg/mL, 30 µg/mL, 20 µg/mL e 10 µg/mL de cada extrato, adicionou-se 2 mL de DPPH e completou-se o volume total do balão com etanol absoluto. Cada amostra foi armazenada e protegida da luz durante 30 minutos. Após esse período, foi observada as mudanças na coloração de cada amostra.

Adicionalmente, foi avaliada a porcentagem da atividade antioxidante para cada extrato mediante leitura no espectrofotômetro UV-Mini da marca Shimadzu em modo fotometria com comprimento de onda (λ) de 518 nm. Foi possível avaliar a porcentagem da atividade antioxidante através da seguinte equação:

$$\% \textit{Atividade antioxidante} = \frac{100 - ((A \textit{ amostra} - A \textit{ branco}) \times 100)}{A \textit{ controle}}$$

Onde:

A amostra = absorbância da solução DPPH (amostras);

A branco = absorbância da solução das amostras sem adição de DPPH;

A controle = absorbância da solução referência de DPPH (etanol).

Esse processo foi realizado para todas as formulações e para cada extrato, tendo o etanol como branco.

4.7 Teste de toxicidade em *Artemia* sp.

O ensaio biológico foi realizado conforme a metodologia proposta pela Associação Brasileira de Normas Técnicas ABNT (NBR) 16530 (2016).

4.7.1 Preparação das amostras e ensaio de letalidade

Foi preparada uma solução estoque de 2 mg/200mL. Para isto, foi pesado 2 mg de FM e FA da folha, FH da casca e FA da raiz. Devido à baixa solubilidade em água salina, cada extrato foi solubilizado em 1mL de DMSO 1%. Seguido, cada amostra foi transferida à balões de 200 mL e imediatamente adicionou-se 199 mL de água salina. A partir da solução preparada anteriormente, fez-se diluições ao 100%, 50%, 25% e 12,5%. O controle negativo foi preparado apenas utilizando água salina. Todas as amostras foram preparadas em quadruplica.

Uma vez feitas as diluições, 10 náuplios vivos foram coletados e semeados com micropipeta em cada uma das amostras. Os tubos permaneceram à temperatura ambiente por 24 horas. Após este período, foi realizada a contagem das larvas vivas em cada tubo, com auxílio de uma lupa, para determinar a letalidade das mesmas aos extratos (ABNT 2016).

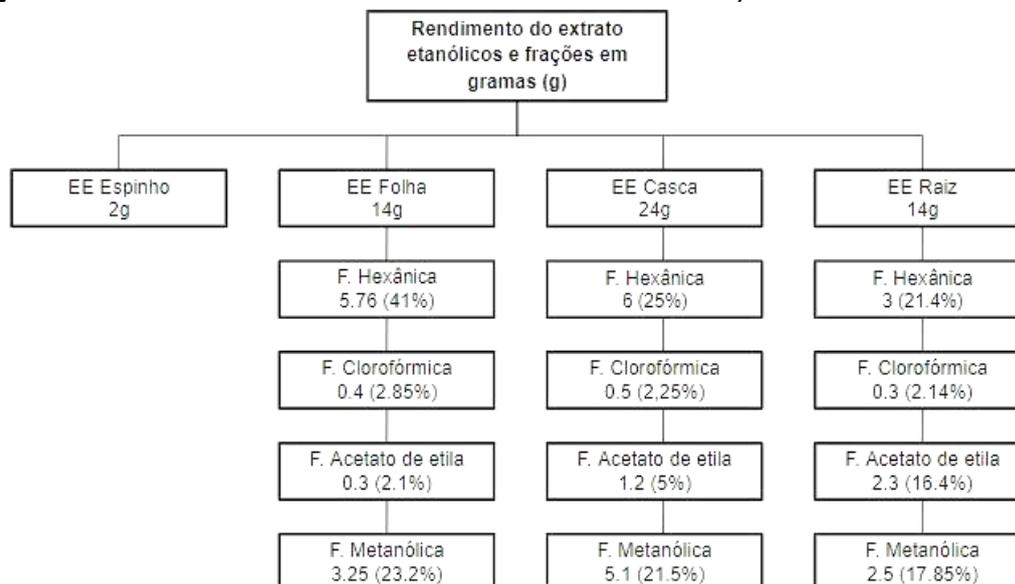
5 RESULTADOS

5.1 Rendimentos dos extratos etanólicos e as frações.

Foi calculado o rendimento das amostras estudadas e expressados em ordem crescente: EE espinho (9%), EE casca (6,45%), EE raiz 5,36% e EE folhas (3,86%) (Figura 5).

Já para as frações obtidas a partir do fracionamento dos extratos etanólicos, evidenciou-se que, para os frações derivadas do EE da folha, a FH (41,1%) e FM (23,2%) apresentaram maior rendimento. Para as frações obtidas a partir do fracionamento do EE da casca, a FH (25%) e FM (21,5%) apresentaram maior rendimento respectivamente. Finalmente, para o EE da raiz, as frações que apresentaram maior rendimento são a FH 21,4%, FM 17,85% e FA 16,4%. Observou-se que, para todos os extratos etanólicos testados, as frações hexânica e metanólica foram as que demonstraram maior rendimento.

Figura 4 - Percentual de rendimento do extrato e as frações.



Fonte: próprio autor, 2019.

5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos

5.2.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

Os resultados obtidos após aplicação do método de microdiluição em caldo, que se observa na tabela 2, mostra baixa e moderada atividade antimicrobiana contra cepas bacterianas Gram positivas e Gram negativas quando expostas aos extratos etanólicos, com exceção do EE folha, o qual não apresentou atividade.

Tabela 2 - Avaliação da menor concentração inibitória do crescimento microbiano (MIC) dos extratos etanólicos da folha, espinho, casca e raiz.

	Amostras testadas CIM($\mu\text{g/mL}$)				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. Flexneri</i>
Extrato etanólico da folha	--	--	--	--	--
Extrato etanólico do espinho	500	500	500	500	1000
Extrato etanólico da casca	1000	1000	1000	1000	1000
Extrato etanólico da raiz	500	500	500	500	1000

Legenda: (-) Não houve inibição.

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Para os EE do espinho e EE da raiz comprovou-se moderada atividade antimicrobiana (500 $\mu\text{g/mL}$) contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* e baixa atividade (1000 $\mu\text{g/mL}$) contra *S. flexneri* respectivamente. O EE da casca apresentou baixa atividade (1000 $\mu\text{g/mL}$) para todos os microrganismos testados. Esses resultados também ressaltam a *S. flexneri* como o microrganismo que apresentou menor sensibilidade aos extratos etanólicos testados.

Tabela 3 - Avaliação da menor concentração inibitória de crescimento microbiano (MIC) das frações obtidas do fracionamento dos extratos etanólicos.

Frações e partes da planta	Microrganismos/CIM($\mu\text{g/mL}$)				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. Flexneri</i>
Folhas					
Metanólica	-	-	-	500	-
Acetato de etila	-	-	-	-	250
Clorofórmica	-	1000	-	-	-
Hexânica	1000	1000	-	-	-
Casca					
Metanólica	-	-	-	1000	-
Acetato de etila	-	1000	-	-	-
Clorofórmica	-	-	-	-	-
Hexânica	-	125	-	-	-
Raiz					
Metanólica	1000	-	-	-	-
Acetato de etila	1000	31	-	-	-
Clorofórmica	-	1000	-	-	-
Hexânica	-	1000	-	-	-

Legenda: (-) Não houve inibição. **Fonte:** Dados da pesquisa, 2019.

Diferente dos resultados obtidos com os EE observou-se que houve um incremento da atividade antimicrobiana quando testadas as frações derivadas dos mesmos. Assim, FM e FA da folha exibiram moderada atividade antimicrobiana (500 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$) contra bactérias Gram negativas, *P. aeruginosa* e *S. Flexneri*, e FH e FCL da folha demonstraram baixa atividade (1000 $\mu\text{g/mL}$) contra bactérias Gram positivas, *S. aureus* e *S. epidermidis* respectivamente.

FA e FH da casca apresentaram baixa e moderada atividade antimicrobiana (1000 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$) contra *S. aureus* e *S. epidermidis*. Únicamente FM da casca demonstrou essa mesma atividade (1000 $\mu\text{g/mL}$) contra bactérias Gram negativos, *P. aeruginosa*. Finalmente, as frações obtidas do EE da raiz somente apresentaram atividade antimicrobiana contra microrganismos Gram positivos, sendo a FA da raiz quem demonstrou alta atividade (31 $\mu\text{g/mL}$) contra *S. epidermidis*. Nenhuma das frações avaliadas apresentou atividade contra *E. coli*.

5.3 Análise Fitoquímica

Realizou-se a análises fitoquímica qualitativa e quantitativa para as frações que apresentaram a melhor atividade antimicrobiana nos testes

de microdiluição em caldo: FM (500 µg/mL) e FA da folha (250 µg/mL), FH da casca (125 µg/mL) e FA da raiz (31 µg/mL).

5.3.1 Caracterização fitoquímica qualitativa

Reportou-se a presença de compostos fenólicos e compostos terpênicos. Assim, esse primeiro grupo foi exibido em três das quatro frações avaliadas, FA da folha, FA da raiz e FH da casca, sendo esta última fração quem apresentou maior quantidade destes compostos, entre eles, fenois, antocianinas, antocianidinas, flavonoides, flavonas, flavononois e xantonas.

Por outro lado, e em menor proporção, também foi exibida a presença de compostos terpênicos nas frações avaliadas, entre eles, esteroides foram encontrados nas FH da casca e FA da folha, triterpenos na FA da raiz e saponinas na FM da folha.

Tabela 4 - Análises fitoquímica qualitativa da FM e FA da folha, FH da casca e FA da raiz.

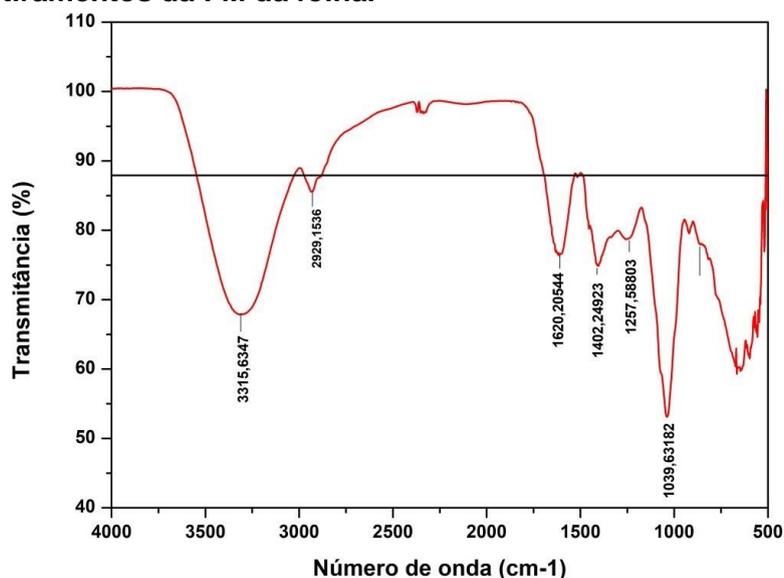
Classes	Caracterização Fitoquímica			
	FM folha	FA folha	FH casca	FA raiz
Fenois	-	-	+	+
Taninos	-	-	-	-
Antocianinas	-	+	+	-
Antocianidinas	-	+	+	-
Flavonoides	-	-	+	-
Flavonas	-	-	+	-
Flavononois	-	-	+	-
Xantonas	-	-	+	-
Esteróides	-	+	+	-
Triterpenos	-	-	-	+
Saponinas	+	-	-	-

Fonte: Próprio autor, 2019.

5.3.4 Espectroscopia de absorção infravermelha

Os resultados obtidos com a análise espectroscópicas infravermelhas para as frações avaliadas confirmaram os dados obtidos da triagem fitoquímica prévia realizada.

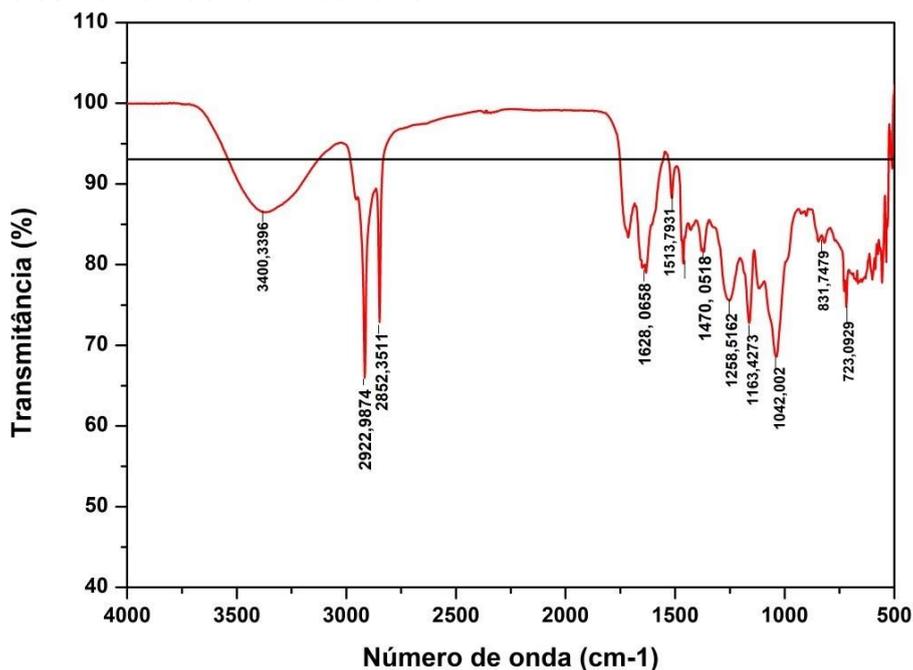
Figura 5 - Espectro de absorção na região do infravermelho e as principais bandas e estiramentos da FM da folha.



Fonte: Próprio autor, 2020.

Assim, na Figura 6 observa-se uma banda longa de estiramento O-H na região 3315 cm^{-1} , próxima de uma banda de estiramento C-H localizada na região 2929 cm^{-1} . Bandas longas de estiramento C-H localizadas entre 1450 e 1375 cm^{-1} são características de metila, assim, como as observadas em 1402 cm^{-1} da mesma figura. Adicionalmente, observa-se um pico longo na região de 1039 cm^{-1} . Picos localizados nessa frequência relacionam-se a presença de ligações C=C. O conjunto de bandas analisadas, apesar de comuns a diversas classes de metabólitos, podem sugerir a presença de saponinas, uma vez que os testes qualitativos indicaram a presença dessa classe nesta fração (PAIVA, 2015).

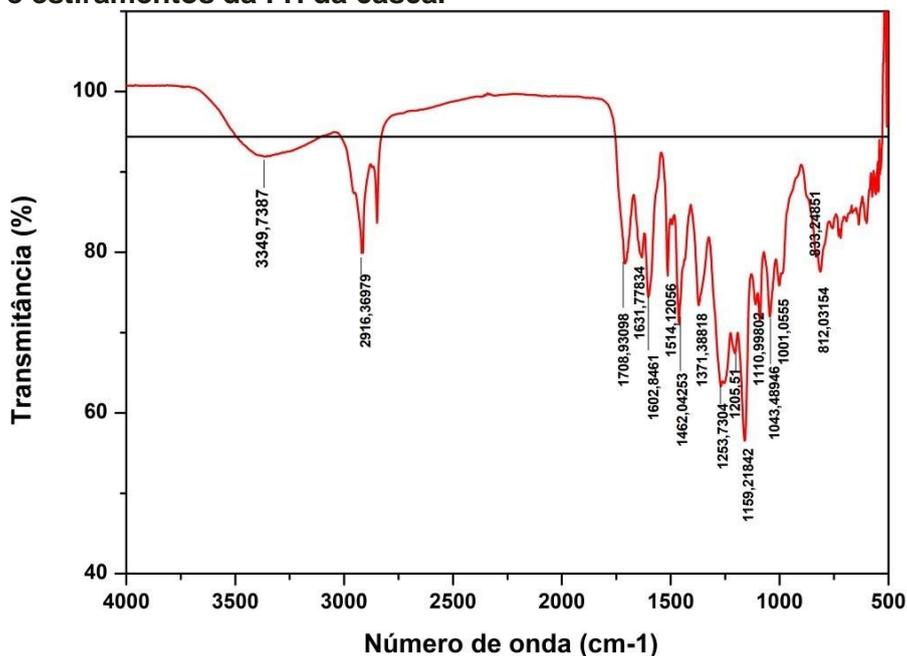
Figura 6 - Espectro de absorção na região do infravermelho e as principais bandas e estiramentos da FA da folha.



Fonte: Próprio autor, 2020.

A continuação, na Figura 7 observa-se uma banda longa de estiramento C-H na região compreendida entre 3500-3000 cm^{-1} . Bandas de estiramento C-H dentro da faixa dos 3000-3050 cm^{-1} se relacionam a presença de compostos aromáticos. Adicionalmente, observou-se um pico de estiramento C-H localizado na região 2922 cm^{-1} . Bandas de estiramento C=C sp^2 observadas em 1628, 1513 e 1470 cm^{-1} confirmam e sugerem a presença de compostos aromáticos. Bandas de estiramento C-H localizadas em 1258, 1163 e 1042 cm^{-1} também foram identificadas. A associação das vibrações encontradas para esta fração, sugerem a presença de compostos fenólicos (antocianinas e antocianidinas) corroborando com os resultados obtidos na avaliação fitoquímica qualitativa (PAIVA, 2015).

Figura 7 - Espectro de absorção na região do infravermelho e as principais bandas e estiramentos da FH da casca.

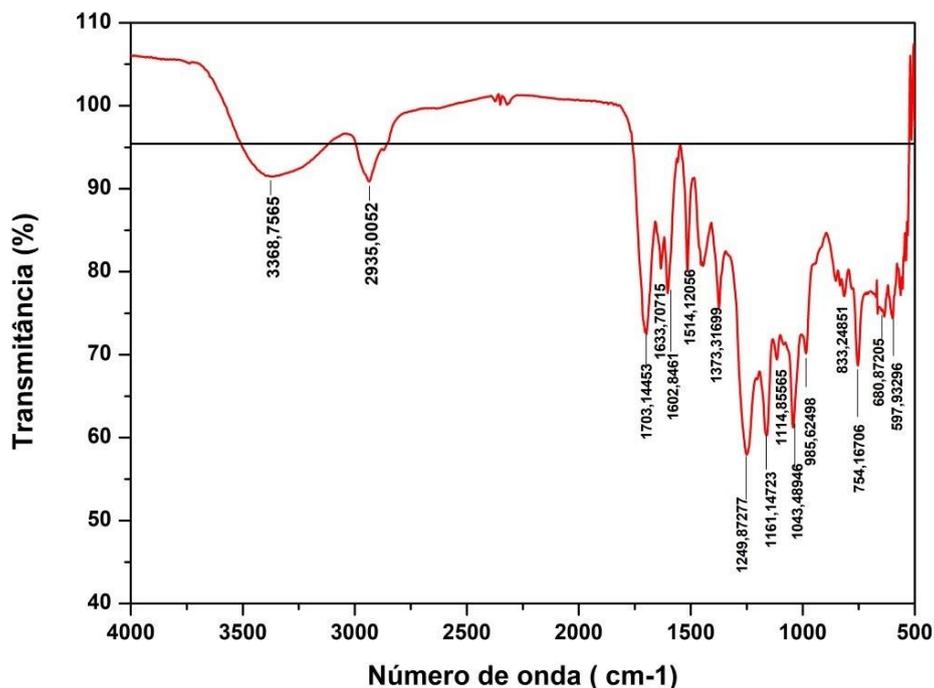


Fonte: Próprio autor, 2020.

O espectro IV da FH da casca revelou bandas de estiramento em 1602, 1514, 1450 cm^{-1} (Figura 8) e 1514-1602 cm^{-1} (Figura 9), características de bandas de estiramento C=C em anéis aromáticos que normalmente aparecem entre 1450 e 1600 cm^{-1} . Adicionalmente, foram identificados picos de desdobramento fora do plano em 833-812 cm^{-1} .

Quando compreendidos entre 900-960 cm^{-1} , esses também são indicadores de anéis aromáticos. De forma complementar, se observou uma banda de estiramento O-H na região 3349 cm^{-1} (Figura 8) e 3368 (Figura 9) e uma banda de estiramento C-O em 1253-1205 cm^{-1} (Figura 4) e 1249-1161 cm^{-1} (Figura 9) (PAIVA, 2015).

Figura 8 - Espectro de absorção na região do infravermelho e as principais bandas e estiramentos da FA da raiz.



Fonte: Próprio autor, 2020.

É característico de espectros IV de compostos fenólicos exibirem a presença de três tipos de bandas: 1) vibrações de estiramento O-H com ligações intermoleculares de H, largas e centradas entre 3400 e 3300 cm^{-1} , 2) vibrações de dobramento C-O-H que produzem alguns picos fracos entre 1400 e 1220 cm^{-1} , geralmente difíceis de observar por encobrimento de picos de dobramento CH₃ que absorvem mais intensamente e aparecem em aproximadamente 1375 cm^{-1} , 3) vibrações de estiramento C-O, com ligações simples entre 1260 e 1000 cm^{-1} . Dado que, essa última banda (C-O) está acoplada com vibrações de estiramento C-C adjacentes, a posição da banda é utilizada para determinar a presença de compostos fenólicos (PAIVA, 2015).

Compostos fenólicos apresentam uma absorção em aproximadamente 1220 cm^{-1} por causa da conjugação do oxigênio com o anel. Deve-se considerar que, essa última frequência supracitada, é utilizada como um valor de referência e, por tanto, diferenças de aproximadamente 30 a 40 cm^{-1} podem ser encontradas quando as

absorções C-O são movidas para frequências mais baixas por insaturação dos átomos de carbono adjacentes ou quando O-H está ligado ao anel (PAIVA, 2015).

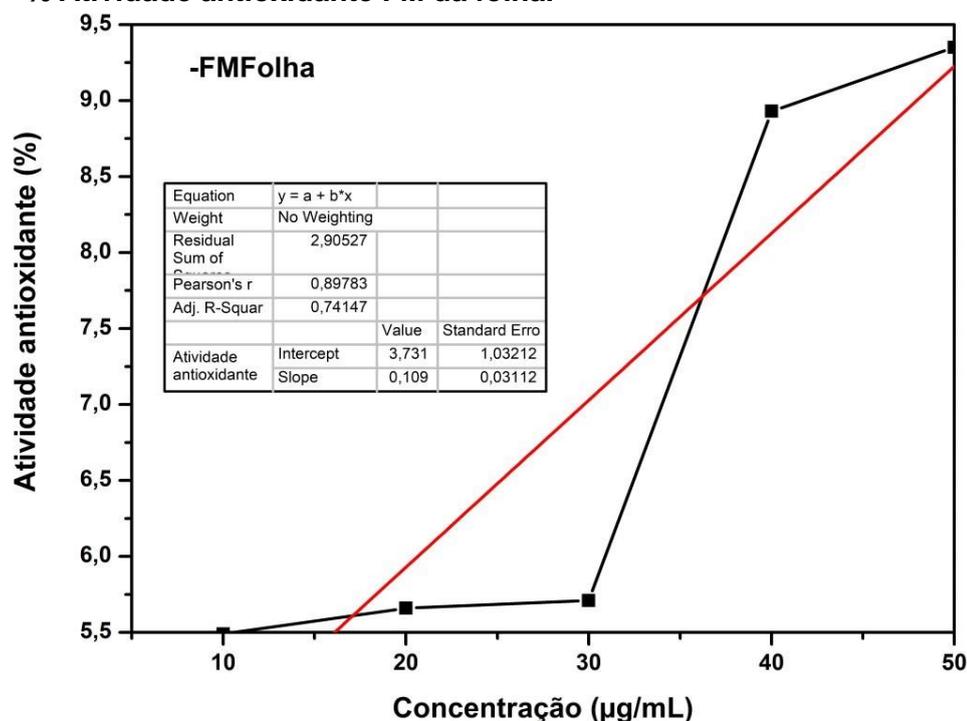
Esses dados sugerem a presença de grupos fenólicos nas frações analisadas e corroboram os dados encontrados nos testes fitoquímicos qualitativos, uma vez que as frações avaliadas exibiram uma ampla variedade desses grupos metabólicos.

5.4. Atividade Antioxidante

5.4.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH

Foi realizada a avaliação da atividade antioxidante para as FM e FA da folha, FH da casca e FA da raiz utilizando o método de sequestro de radicais livres do DPPH.

Figura 9 - % Atividade antioxidante FM da folha.

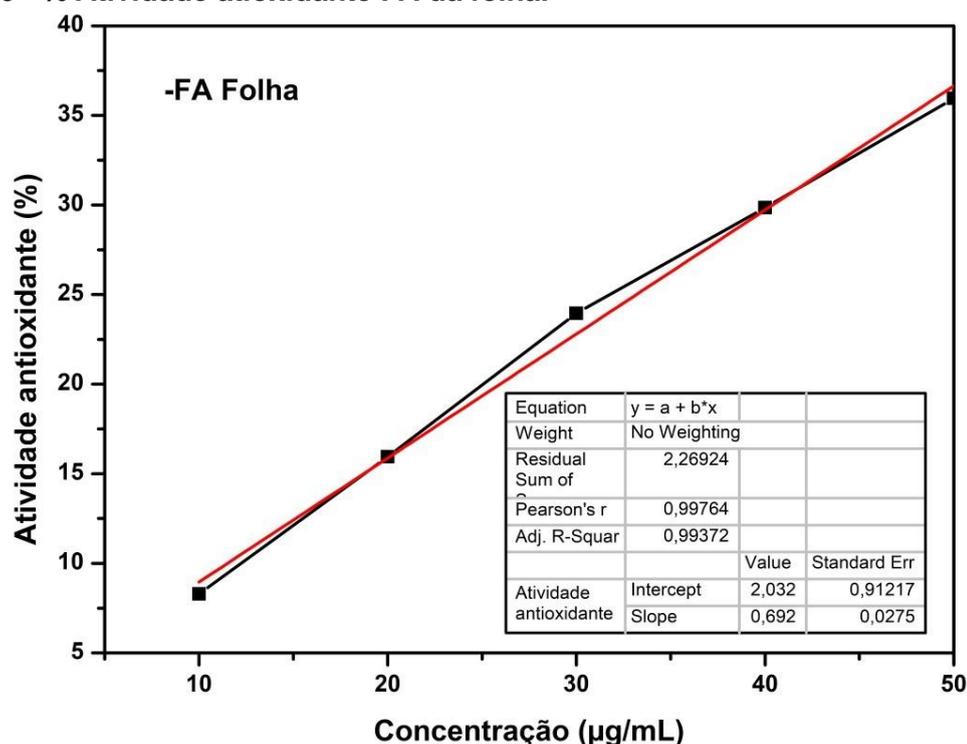


Fonte: Próprio autor, 2020.

Inicialmente, testaram-se as frações metanólica e acetato de etila de folhas. Para as duas, os resultados evidenciaram baixa capacidade

sequestradora do radical livre DPPH, sendo a fração metanólica quem apresentou menor atividade, 9,35% na concentração de 50µg/mL, 8,93% na concentração de 40 µg/mL e valores inferiores à 6% quando testada nas concentrações restantes.

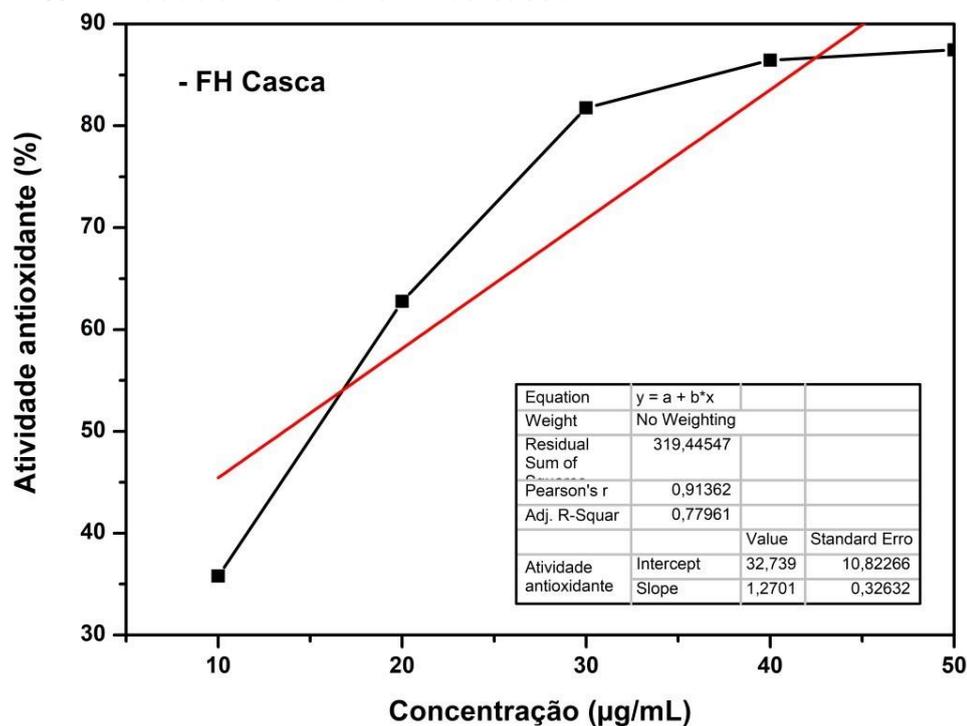
Figura 10 - % Atividade antioxidante FA da folha.



Fonte: Próprio autor, 2020.

Para a FA, se evidenciou maior atividade antioxidante que a FM da folha. Assim, obtiveram-se os seguintes porcentagens de atividade antioxidante: 50 µg/mL (35,95%), 40 µg/mL (29,85%), 30 µg/mL (23,95%), 20 µg/mL (15,95%) e 10 µg/mL (8,29%).

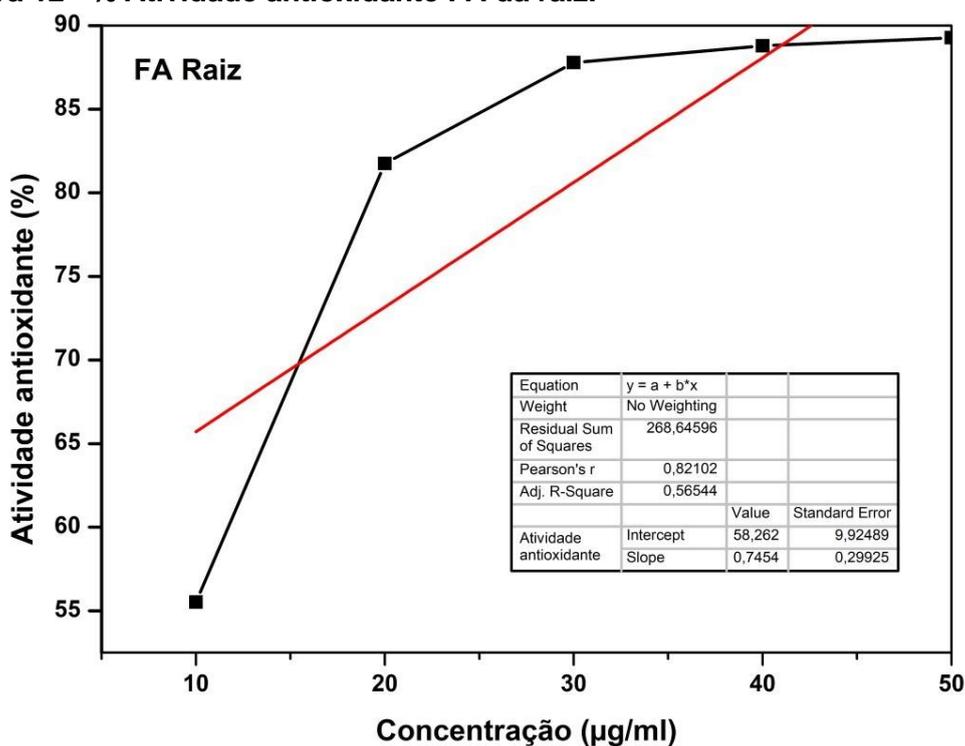
Figura 11 - % Atividade antioxidante FH da casca.



Fonte: Próprio autor, 2020.

Já a FH da casca e FA da raiz exibiram a maior atividade antioxidante para cada uma das concentrações testadas. A FH da casca apresentou as seguintes porcentagens de atividade antioxidante: 50 µg/mL (87,45%), 40 µg/mL (86,45%), 30 µg/mL (81,76%), 20 µg/mL (62,76%) e 10 µg/mL (35,39%).

Figura 12 - % Atividade antioxidante FA da raiz.



Fonte: Próprio autor, 2020.

Finalmente, FA da raiz, demonstrou porcentagens superiores à 80% e muito próximos de 90%. Assim, obtiveram-se os seguintes valores: 50 µg/mL (89,27%), 40 µg/mL, (88,79%), 30 µg/mL (87,79%), 20 µg/mL (81,75%) e 10 µg/mL (55,52%).

A Tabela 5 expressa os valores de IC50 para cada uma das frações testadas. Esses resultados confirmam que a FA da raiz foi a fração que apresentou melhor atividade antioxidante, seguida da FH da casca, FA e FM da folha.

Tabela 5 - Atividade sequestradora do radical livre DPPH de frações de folha, casca e raiz de *Encholirium spectabile*.

Amostras	DDPH (IC50)
FM da folha	421,01
FA da folha	69,29
FH da casca	20,67
FA da raiz	12,25

Fonte: Próprio autor, 2020.

5.5 Avaliação do potencial citotóxico

A Tabela 6 expressa os valores em porcentagem de mortalidade para cada fração nas diferentes concentrações testadas. Quando testadas nas concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL e 250 µg/mL as frações FM e FA da folha e FA da raiz não se evidenciou morte de náuplios. Diferente das anteriores, a FH da casca, quando testada a 500 µg/mL e 250 µg/mL, houve morte de náuplios equivalente à 2,5% e 5% da população total.

Tabela 6 - Concentração letal em % das frações testadas.

Frações	Concetração Letal (%)				
	0	12,5	25	50	100
FM da folha	0	0	0	0	17,5
FA folha	0	0	0	0	10
FH da casca	0	0	2,5	5	22,5
FA da raiz	0	0	0	0	17,5

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Para todas as frações exibiu-se morte de náuplios quando testadas a 2000 µg/mL (100%), sendo a FM da folha quem apresentou menor porcentagem de mortalidade 10%, seguido das frações FA folha e FA da raiz, 17,5% respectivamente. A FH da casca apresentou a porcentagem mais alta de mortalidade, 22,5% entretanto, não é considerado um valor significativo de mortalidade.

6. DISCUSSÃO

Foi comprovada a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos e das frações testadas. Não obstante, diferente dos resultados reportados por outros autores, extratos etanólicos da folha não exibiram essa atividade contra nenhuma dos microrganismos testados.

Em seu estudo, Santana e colaboradores (2012) relataram a baixa e moderada atividade antibacteriana de extratos etanólicos das folhas contra *S. aureus* (625 mg/mL), *S. flexneri* (625 mg/mL) e *E. Coli* (156 mg/mL). Fernandes e colaboradores (2014) também reportaram essa mesma atividade em isolados de *E. coli* de suínos quando testados com extratos etanólicos de folhas de *Encholirium spectabile*.

Fatores ambientais e fisiológicos como a época em que realizada a coleta, sazonalidade, ciclo circadiano, idade ou desenvolvimento da planta, assim como dos órgãos vegetais, entre outros, puderam influir diretamente na síntese e concomitantemente na expressão da atividade biológica das amostras avaliadas (NETO & LOPES, 2007; CHAVES, 2012).

Por outro lado, EE do espinho, EE da casca e EE da raiz apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as cepas testadas, na faixa entre 1000 e 500 µg/mL, sendo o EE do espinho e EE da raiz os que apresentaram maior atividade.

Estes resultados são similares aos obtidos por Silva e colaboradores (2014). Em sua investigação, reportaram o potencial antimicrobiano de extratos aquosos e etanólicos de *Encholirium spectabile* frente a isolados Gram negativos da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas. Embora, extratos aquosos somente demonstraram atividade contra isolados de *Acinetobacter* spp., a totalidade dos microrganismos testados, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp. e *Klebsiella* spp., apresentaram sensibilidade quando os extratos diluídos em etanol. Este fato evidencia que a extração de metabólitos secundários resulta mais eficiente quando realizada em este solvente (SILVA et al., 2014).

Estudos experimentais realizados com espécies pertencentes à mesma família, Bromeliaceae, evidenciam e confirmam o potencial microbicida que esta família possui. Peixoto e colaboradores (2016) avaliaram a atividade

antimicrobiana de extratos etanólicos de *Neoglaziovia variegata*, *Bromelia laciniosa* e *Encholirium spectabile* contra *Staphylococcus* spp. isolados de casos subclínicos de mastites aguda em ruminantes, sendo *Encholirium spectabile* quem demonstrou maior atividade frente às cepas testadas.

Em relação a atividade antimicrobiana das frações testadas, observou-se que houve um incremento dessa atividade. Também, se evidenciou que este incremento foi proporcional ao aumento na polaridade dos solventes utilizados. Assim, pode-se inferir que os metabólitos que apresentaram melhor atividade se encontram nas frações mais polares.

Diferente aos resultados apresentados em relação aos EE da folha, todas as frações derivadas dos mesmos demonstraram atividade antimicrobiana para cada uma das cepas testadas, além, a FM e FA da folha, 500 e 250 µg/mL respectivamente, terem expressado a melhor atividade antimicrobiana (moderada) para cepas Gram negativas quando comparadas com outras frações. Ainda que, estes resultados, quando comparados com outros estudos coincidem na presença de atividade antimicrobiana para as frações hexânica, acetato de etila e clorofórmica, diferem em porcentagem de sensibilidade e microrganismos alvos para cada fração testada (SANTANA et al., 2012).

No estudo apresentado por Santana, as frações hexânica, acetato de etila e clorofórmica evidenciaram moderada atividade antibacteriana contra cepas Gram positivas (*S. aureus*) e Gram negativas (*E. coli* e *S. Flexneri*), diferente dos resultados reportados nesta pesquisa, onde unicamente as frações FH da folha (1000 µg/mL) e FC da folha (1000 µg/mL) apresentaram baixa atividade para microrganismos Gram positivos (*S. aureus* e *S. Epidermidis*) e as frações metanólica (500 µg/mL) e acetato de etila da folha (250µg/mL) demonstraram moderada atividade antimicrobiana contra bactérias Gram negativas, *P. Aeruginosa* e *S. flexneri*.

O estudo do constitutivo metabólico de extratos derivados de plantas com potencial medicinal permite estabelecer a relação entre uma determinada atividade biológica e o grupo funcional responsável pela mesma. Para Matos (2009), a partir de reações colorimétricas ou de precipitação é possível determinar os grupos funcionais presentes para cada extrato. A análise preliminar das frações avaliadas evidenciou a presença de uma pluralidade de

biomoléculas pertencentes a duas, das três classes de espécies metabólicas mais importantes para estes compostos, fenóis e terpenos (VARÓN e GRANADOS, 2012; FERNANDES et al., 2019). Entretanto, essa diversidade metabólica se encontrou em cada uma das frações testadas.

Os compostos fenólicos, também conhecidos como polifenóis, representam a classe de metabólitos secundários majormente distribuídos no reino vegetal (KULBAT, 2016; OLIVEIRA – JUNIOR, 2014). Sua estrutura está conformada por um grupo básico, o fenol, composto por um anel aromático hidroxilado (LIN et al., 2016). Dada sua ampla distribuição diferentes estruturas já foram caracterizadas, portanto, possuem uma variada diversidade estrutural, levando à classificação atual dos mesmos em flavonoides e ácidos fenólicos (SOOBATTE et al., 2005). Antocianidinas, flavonas, isoflavonas, flavonóis, flavonas e flavonóis pertencem a essa primeira denominação (LIN et al., 2016).

Sua presença em extratos vegetais está associada a numerosas propriedades biológicas de interesse medicinal, entre elas, prevenção de doenças cardiovasculares (HUERTA et al., 2015) e neurodegenerativas (MORATO et al., 2015), fotoprotetora, hipoglicemiantes e antioxidantes (LIN et al., 2016; HUNG, 2014), antiinflamatória (PEREZ et al., 2016), antimicrobiana (KARACA E NEWMAN, 2015), Antifúngica (MARTINS, 2015), entre outras. A presença dessa classe metabólica já foi evidenciada em espécies pertencentes à família bromeliaceae. Coelho e colaboradores (2010) analisaram e a composição fitoquímica de extratos metanólicos de frutos e raízes de *Bromelia balansae* e reportaram altos valores destes compostos.

Rocha e colaboradores (2010) descreveram a presença de flavonoides em extratos metanólicos de *Ananas bracteatus*. Delaporte e colaboradores (2004) comprovaram que extratos metanólicos exibiam na sua composição diferentes tipos de flavonoides. Williams (1978) participou no estudo e identificação de flavonas e flavonóis em cerca de 37 espécies de bromélias. Osorio e colaboradores (2017) a partir da caracterização fitoquímica de extratos de frutos de *Bromelia karatas*, lograram identificar a presença de flavonoides.

Satto e Harborne (1983) contribuíram na descoberta e identificação de antocianinas em cerca de 24 espécies de *Bromelia*. Scogin e colaboradores (1985) participaram na identificação de antocianinas em 9 espécies desta

família. Recentemente, Bellotto e colaboradores (2014) em seu estudo relataram a presença de antocianinas e taninos em extratos hidroalcoólicos de folhas de *Guzmania lingulata*. As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis de importante atividade antioxidante, responsáveis pela coloração vermelha, laranja e violeta de flores e frutos. São encontradas com exclusividade em alimentos de origem vegetal (BROUILLARD, 1982).

No que se refere à *Encholirium spectabile*, são escassos os estudos encontrados da análise fitoquímica desta espécie. Carvalho e colaboradores (2010) em seu estudo para a avaliação da atividade antiulcerogênica em extratos etanólicos de *Encholirium spectabile*, lograram quantificar o teor de fenois presentes nos mesmos. A partir dos resultados obtidos demonstraram e associaram o potencial gastroprotetor à presença de compostos fenólicos nesta espécie.

Estes resultados foram confirmados por Oliveira-Júnior e colaboradores, quem, na sua pesquisa, comprovaram a presença de compostos fenólicos em extratos etanólicos de folhas e suas frações clorofórmica e acetato de etila.

No estudo realizado por Santana e colaboradores (2012) foi exibida a presença de flavonoides e taninos em extratos etanólicos, hexânicos, clorofórmicos e acetato de etila desta espécie.

Diferente dos resultados reportados por Santana, nesta pesquisa unicamente foi detectada a presença de antocianinas e antocianidinas na FA da folha. Não obstante, foram identificados fenois na FA da raiz e flavonoides, flavonas, flavononóis e xantonas foram identificadas na FH da casca.

São conhecidas as implicações do uso de diferentes solventes sobre a extração de diferentes constituintes metabólicos. Arroy e colaboradores (2017) comprovaram a eficácia da extração metanólica de compostos fenólicos de extratos de casca de *Renealmia alpinia* sobre outras substâncias como o etanol e acetona. Além da escolha do solvente, a técnica extrativa utilizada também influencia na concentração e tipos metabólitos obtidos no final da extração.

Esteróides são compostos terpênicos pertencentes ao grupo dos triterpenos (RAFIA, 2013). Sua presença no reino vegetal está associada a funções estruturais da parede celular, como constituinte da bicapa lipídica (GYLLIING & SIMONEN, 2015; PIIRONEN, 2000). Vários autores citam a

existência de mais de 200 tipos de esteróides vegetais, denominados fitoesteróis (BRUFAU; CANELA; BRAFECAS, 2008; FERNANDES, 2015). Este grupo metabólico faz parte de uma importante família de biomoléculas de importante valor farmacológico e medicinal.

Sua ocorrência nas plantas é abundante, podendo ser encontrado principalmente em frutas e sementes ricas em lipídeos como nozes, amendoim, grãos e alguns legumes (BRUFAU; CANELA; BRAFECAS, 2008; RIBEIRO, 2016). Em bromeliaceae, acredita-se que sua presença está restrita principalmente as subfamílias Bromelioideae e Tillandsioideae (MANETI; DELAPORTE; LAVERDE, 2009). No entanto, estudos recentes têm posicionado este grupo metabólico em outras espécies desta família (SOUZA, 2015). Rocha e colaboradores (2010) a partir de técnicas cromatográficas e espectroscópicas realizadas em extratos metanólicos de folhas de *Ananas bracteatus*, lograram identificaram quatro tipos de esteróides.

Delaporte e colaboradores (2004) a partir do fracionamento da fração metanólica de partes aéreas de *Tillandsia streptocarpa*, constataram a presença de dois tipos de esteroides: cycloartenol 1,4',5-dihydroxy uma mistura de stigmasterol, β -sitosterol e campesterol. Delaporte e colaboradores (2004) a partir do fracionamento da fração metanólica de partes aéreas de *Tillandsia streptocarpa*, constataram a presença de dois tipos de esteroides: cycloartenol 1,4',5-dihydroxy uma mistura de stigmasterol, β -sitosterol e campesterol.

Em seu estudo, Juvik e colaboradores (2017) analisaram o perfil fitoquímico de três espécies de bromélias nativas da Caatinga brasileira, *Bromelia laciniosa*, *Neoglaziovia variegata* e *Encholirium spectabile*. Foi observada a presença de aproximadamente 20 compostos apolares, entre eles, triterpenos, alguns ácidos graxos e alcanos de cadeia longa.

Santana e colaboradores (2012) constataram que, frações hexânicas, Clorofórmicas e acetato de etila de folhas de *Encholirium spectabile* exibiram esteróides e triterpenos na sua composição.

Outro tipo de terpenos, as saponinas, foram detectadas na FM da folha. Sua presença em extratos vegetais tem sido relacionada com uma ampla variedade de aplicações farmacêuticas e cosméticas (CHEEKE, 2001). Diversos estudos evidenciam o potencial medicinal deste grupo metabólico:

atividade surfactante (CHEEKE, 2001; ESTRADA, 2017), antioxidante e antiglicante (FIGUEIREDO, 2018) antifúngica (NETO, 2019), antiinflamatória (SULTANA & ATA, 2008), hemolítica e antimicrobiana (DE LEO, 2006).

Claramente, à presença deste grupo metabólico pode-se atribuir a atividade antimicrobiana apresentada por essa fração. Na caracterização fitoquímica realizada por Santana (2012) em extratos etanólicos da folha de *Encholirium spectabile* não foi descrita a presença esta molécula.

A atividade antioxidante de extratos de *Encholirium spectabile* foi estudada por distintos autores. Santana e colaboradores (2012) reportaram o potencial antioxidante de extratos etanólicos, hexânicos, acetato de etila e clorofórmicos desta mesma espécie. Das frações testadas, a fração acetato demonstrou alta capacidade sequestradora deste radical na concentração de 18µg/mL. Os extratos restantes, etanólico, hexânico, acetato de etila e clorofórmico expressaram atividade antioxidante nas concentrações de 47 µg/mL, 243 µg/mL e 56 µg/mL respectivamente.

Para Santana, o perfil fitoquímico exibiu a presença de compostos fenólicos para cada fração e a quantificação de fenois e flavonoides totais corroboraram os achados obtidos na análise fitoquímica (SANTANA et al., 2012).

Oliveira e colaboradores (2013) analisaram o potencial antioxidante e fotoprotetor de extratos e frações de folhas de *Encholirium spectabile*. Observou-se que, a fração clorofórmica apresentou o melhor índice de atividade antioxidante quando testada na concentração de 25 µg/mL. Os extratos etanólicos, hexânicos, a acetato exibiram moderado potencial antioxidante nas seguintes concentrações: 39,24 µg/mL, 243 µg/mL e 57,64 µg/mL. A análise do perfil fitoquímico realizado por este autor também demonstrou a presença de compostos fenólicos em extratos e frações de folhas desta planta.

Quando comparado com outras espécies da mesma família, a literatura corrobora o potencial antioxidante, fotoprotetor, medicinal e cosmético. Espinoza e colaboradores (2018) demonstraram a atividade antioxidante de biopéptidos extraídos de frutos de *Bromelia pinguin* e *Bromelia karatas*.

Prospitti e colaboradores (2015) reportaram o potencial antioxidante de extratos de frutas de *Bromelia balansae*. Oliveira e colaboradores (2013)

relataram essa mesma atividade em extratos hidroalcoólicos de *Neoglaziovia variegata*. Esse mesmo autor comprovou a atividade antioxidante e fotoprotetora de extratos de diclorometano, etanólicos e metanólicos de flores de *Bromelia laciniosa* (OLIVEIRA et al., 2017). Uma pesquisa desenvolvida por Krumreich e colaboradores (2014) relacionou o potencial antioxidante de frutos de *Bromelia anticantha* a presença de compostos fenólicos na sua composição. Osorio et al. (2017) comprovou a atividade antioxidante em extratos de frutos de *Bromelia karatas*.

São escassos os trabalhos encontrados relacionados à *toxicidade* em espécies com potencial medicinal. Um único estudo realizado por Saraiva e colaboradores (2013) avaliaram o risco de toxicidade em camundongos após administração de doses de 2 g/kg e 5 g/kg de peso de extrato etanólico de *Encholirium spectabile*. Os animais foram observados por um período de 72 horas durante 14 dias. A partir dos resultados obtidos concluiu-se que não houve sinais de toxicidade aguda nos animais expostos.

Em outro estudo Saraiva e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antinociceptiva e toxicidade aguda de extratos etanólicos de folhas de *Bromelia laciniosa*. Foram administradas doses intraperitoneais de 2 g/kg e orais de 5 g/kg de extrato etanólico de *Bromelia laciniosa* em camundongos. Os animais foram observados cada 72 horas durante 14 dias para detectar sinais de toxicidade aguda, como perda de peso e apetite ou diminuição de consumo de água. Diferente dos resultados obtidos quando testados extratos etanólicos de *Encholirium spectabile*, neste estudo foi reportado baixos níveis de toxicidade.

Castro e colaboradores (2017) em seu estudo descreveram as principais espécies medicinais do norte, centro e caribe americano consumidas por essas comunidades e consideradas tóxicas. Um total de 216 espécies pertencentes a 77 famílias foram reportadas como tóxicas para o consumo humano. Dentre elas, duas espécies pertencem à família Bromeliaceae, *Bromelia pinguin* e *Bromelia plumieri*, comumente utilizadas para o tratamento de resfriados e inflamação. Segundo Castro, diversos relatos de casos de dermatites aguda foram reportados após o consumo dos frutos destas espécies.

Balin e colaboradores (2018) investigaram o potencial toxicológico e

antiinflamatório de extratos etanólicos de *Bromelia balansae*. Foram administradas doses de 2 mg/kg de peso corporal de extrato etanólico de frutas de *Bromelia balansae* em ratos. Durante 14 dias os animais foram observados periodicamente, cada 24 horas, para detectar sinais de toxicidade. No decurso da pesquisa não foram observados sinais de toxicidade nos animais, entretanto, evidenciou-se a perda de apetite sem perda de peso nos animais avaliados.

Nos estudos apresentados foram reportados baixos níveis de toxicidade para extratos etanólicos de espécies pertencentes à família Bromeliaceae, não obstante, nos estudos experimentais realizados com extratos de *Encholirium spectabile*, incluindo esta pesquisa, não foram evidentes sinais de toxicidade nos organismo-teste.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, a partir dos resultados obtidos conclui-se que:

- Os extratos etanólicos brutos apresentaram baixa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, com exceção de *Shigella Flexneri*, já as frações FH da casca e FA da raiz demonstraram alta e moderada atividade antimicrobiana contra *S. epidermidis*, 31 µg/mL e 125 µg/mL respectivamente. Já as frações FA da folha (250 µg/ml) e FM da folha (500 µg/mL) apresentaram moderada e baixa atividade antibacteriana contra cepas Gram negativas, *P. aeruginosa* e *Shigella flexneri*;
- A exceção da FM da folha, a análises fitoquímica das frações testadas evidenciou principalmente a presença de compostos fenólicos nas frações testadas: fenóis, antocianinas, antocianidinas, flavonoides, flavonas, flavononois e xantonas; a FM da folha e FA da raiz adicionalmente, exibiram compostos terpênicos na sua composição: saponinas e triterpenos;
- A FA da raiz apresentou a melhor atividade antioxidante demonstrando porcentagen superiores a 80% quando testadas nas concentrações de 50 µg/mL, 40 µg/mL, 30 µg/mL, 20 µg/mL e 10 µg/mL e a FH da casca aprentou alta atividade antioxidante, demonstrando resultados similares a fração supracitada (80%) quando testada nas concentrações 50 µg/mL, 40 µg/mL e 30 µg/mL.
- As amostras testadas não apresentaram toxicidade.
- Esses resultados confirmam o potencial medicinal e biotecnológico da eespécie estudada, sendo necessário o investimento em novos estudos que permitam o aproveitamento desta espécie vegetal.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar o isolamento das substâncias ativas das frações FH da casca e FA da raiz, seguido de avaliação fitoquímica quantitativa através de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (RMN), ultravioleta (UV).
- Implementar ensaios de cicatrização *in vitro* para contribuir á conhecimento do potencial biológico desta espécie.

8 REFERÊNCIAS

- ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas, NBR-16530. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método com ensaio com *Artemia* sp (Crustacea:Brachiopoda)**, 2016.
- ACKER, S. B. E. V. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 20, p.331-342, 1996.
- ALVES, L. M. M. et al. Pesquisa Básica na Enfermagem. **Revista Latinoamericana de Enfermagem**. 2004, 12(1):122-7.
- ARAÚJO, N. R. R. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral. 100p. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Pará. Belém (PA), Belém, 2010.
- ARROY, J. D. V. et al. Effect of Solvents and Extraction Methods on Total Anthocyanins, Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas Peel. **Food Technology and Economy, Engineering and Physical Properties**. 2017, (5): 456–465.
- ARSHAD, Z. M. et al. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2014, 98:7283–7297.
- BALIN, P. S. et al. Toxicological evaluation and anti-inflammatory potential of an ethanolic extract from *Bromelia balansae* (Bromeliaceae) fruit. **Journal of Ethnopharmacology**. 2018, 79-86.
- BELLOTO, E. M. et al. Caracterização anatômica, histoquímica e de classes de metabólitos secundários de folhas de *Guzmania lingulata* (L.) Mez. **Rev. Bras. Pl. Med**. 2014, v.16, n.1, p.127-134.
- BOLSON, M. et al. Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 2014, 161(2015)1–10.
- BORLOTTO, T. Avaliação da atividade tóxica e genotóxica de percolados do aterro sanitário de sombrio-SC utilizando *Artemia* sp e *Allium cepa* L. 2007. 70p. Trabalho de conclusão de curso em Ciências biológicas – Universidade do Extremo Sul Catarinense.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília : Ministério da Saúde, 2006.

- BRUFAU, G.; CANELA., M. A.; RAFECAS, M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition Research**. 2008, 217–225.
- CANDEL, F. J.; PENUELAS, M.; LEJARRAGA, C.; GONZALEZ, L. L.; PRIETO, J. M.; MENDOZA, D. L. Activity of linezolid and tedizolid against clinical isolates of methicillin-resistant and methicillin and linezolid resistant *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* comparison. **Rev Esp Quimioter**. 2016;29(5): 255-258.
- CASTILHO, P. C.; SAVLUCHINSKE-FEIO, S.; WEINHOLD, T. S.; GOUVEIA, S. C. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. **Food Control**, v. 23, p. 552- 558, 2012.
- CASTRO, A. J. A. et al. Medicinal Plants from North and Central America and the Caribbean Considered Toxic for Humans: The Other Side of the Coin. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**. 2017.
- CERON, K. et al. POTENCIAL MEDICINAL E ALIMENTÍCIO DA VEGETAÇÃO HERBÁCEA TERRÍCOLA CILIAR NO SUL DO BRASIL. **INTERCIENCIA**. 2016, VOL. 41 N° 6 .
- CHEEKE, P. R. Actual and potential applications of *Yuccaschidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. **Recent Advances in Animal Nutrition in Australia**. 2001, v. 13, pp. 115-126. CLSI 2012. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty informational supplement**. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute.
- CORNAGLIA, G. Fighting infections due to multidrug-resistant Gram-positive pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 3, p. 209-211, 2009.
- COELHO, R. G. et al. Chemical Composition and Antioxidant and Antimycobacterial Activities of *Bromelia balansae* (Bromeliaceae). **JOURNAL OF MEDICINAL FOOD**. 13. (5). 2010, 1277–1280.
- CRAYN, D. M. et al. Photosynthetic pathways in Bromeliaceae: phylogenetic and ecological significance of CAM and C3 based on carbon isotope ratios for 1893 species. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 2015, 178, 169–221.
- DENISOV, E. T. Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Boca Raton: CRC. **Taylor & Francis Group**, 2005. 981p.
- DE LEO, M. et al. Triterpenoid saponins from *Pteleopsis suberosa* stem bark. **Phytochemistry**. 67 (2006) 2623–2629.

ERRASTI, M. E. et al. Effects on fibrinogen, fibrin, and blood coagulation of proteolytic extracts from fruits of *Pseudananas macrodentes*, *Bromelia balansae*, and *B. Hieronymi* (Bromeliaceae) in comparison with bromelain **Wolters Kluwer Health**. 2016, 27:441–449.

ESPINOZA, L. M. et al. Aspectos etnobotánicos, nutricionales y actividad biológica de extractos de frutos del género *Bromelia*. **Rev. Fitotec. Mex.** Vol. 40 (4): 425-437, 2017.

ESPINOZA, L. M. et al. Enzyme activity and partial characterization of proteases obtained from *Bromelia karatas* fruit and compared with *Bromelia pinguin* proteases. **Food Sci Biotechnol.** (2018) 27(2):509–517.

ESPINOZA, L. M. et al. Antioxidant capacity of egg, milk and soy protein hydrolysates and biopeptides produced by *Bromelia pinguin* and *Bromelia karatas*- derived proteases. **Emirates Journal of Food and Agriculture**. 2018. 30(2): 122- 130.

Estrada, K. M. U. Análisis de las propiedades surfactantes de saponinas obtenidas de los frutos de *Sapindus saponaria* L. 2017. Trabalho de conclusão de curso (Químico Farmacéutico) – Universidad Central del Ecuador, Ecuador, 2017.

FERNANDES, A. W. C. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas do bioma caatinga em isolados de *Escherichia coli* de suínos. **Rev. Bras. Pl. Med., Campinas** . v.17, n.4, p.1097-1102, 2015.

FERNANDES, A. D. C. et al. Esteróis e Estanóis na matriz alimentar: Relação com a redução dos níveis de colesterol e a redução de risco de doenças coronárias. 2015. Dissertação (Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia de Alimentos). Universidade de Lisboa, Lisboa, 2015.

FERNANDES, B. F. et al. Estudo etnofarmacológico das plantas medicinais com presença de saponinas e sua importância medicinal. **Revista da Saúde da Ajes**. V. 5, n. 9, 2019.

FERRARI, E. A. P. et al. Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. by the vitrification method. **Revista Ciência Agronômica**. 2016, v. 47, n. 1, p. 172-177.

FIGUEREIDO, C. C. M. et al. Atividade antioxidante, antiglicante e microencapsulação de extrato e saponinas obtidas de *Tribulus terrestris*. 2018. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2018.

FORZZA, R. C. Revisão taxonomica de *Encholirium spectabile* mart. Ex Schult. & Shult. F. (Pitcarnoideae – Bromeliaceae). 2005. Tese (Doutorado em Biociencias) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GIVNISH, T. J. et al. Phylogeny, Adaptive Radiation, and Historical

Biogeography of Bromeliaceae Inferred from ndhF Sequence Data. **Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany**. 2007, 23, pp. 3–26.

GIVNISH, T. J. et al. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 71 (2014) 55–78.

GYLLING H; SIMONEN P. Phytosterols, Phytostanols, and Lipoprotein Metabolism. **Nutrients**. 2015, 7, 7965-7977.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 96, p. 67–202, 2002.

HERNANDEZ, J. M. M. et al. Partial Characterization of the Proteolytic Properties of an Enzymatic Extract From *Aguama* and *Bromelia pinguin* L. Fruit Grown in Mexico. **Appl Biochem Biotechnol**. 2016.

HUERTA, O. R. et al. A Systematic Review of the Efficacy of Bioactive Compounds in Cardiovascular Disease: Phenolic Compounds. **Nutrients**. 2015, 7, 5177-5216.

HUNG, P. Phenolic compounds of cereals and their antioxidant capacity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 2014.

IMA Instituto do Meio Ambiente de Alagoas. 2015.
Disponível em: <http://ima.al.gov.br/>.

JUVIK, O. L. et al. Non-Polar Natural Products from *Bromelia laciniosa*, *Neoglaziovia variegata* and *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae). **Molecules**. 2017, 22, 1478.

KARACA HC; NEWMAN MC. Antimicrobial efficacy of plantphenolic compounds against Salmonella and *Escherichia Coli*. **Food Bioscience**. 2015.

KRUMREICH, F. D. et al. Composição físico-química e de compostos bioativos em FRUTOS de *Bromelia antiacantha* Bertol. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal**. v. 37, n. 2, p. 450-456, Junho 2015.

KULBAT, K. The role of phenolic compounds in plant resistance. **Biotechnology and Food Sciences**. 2016, 80 (2), 97-108.

LIN, D. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. **Molecules**. 2016, 21, 1374.

- MACEDO, J. G. F. et al. Analysis of the Variability of Therapeutic Indications of Medicinal Species in the Northeast of Brazil: Comparative Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2018.
- MAKKAR, H. P.S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Plant Secondary Metabolites. New Jersey: Humana Press, 2007.
- MALES, J. Think tank: water relations of Bromeliaceae in their evolutionary context. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 2016, 181, 415–440.
- MALES, J. Concerted anatomical change associated with crassulacean acid metabolism in the Bromeliaceae. **Functional Plant Biology**. 2018.
- MARTINS, J. L. R. et al. Medicinal species with gastroprotective activity found in the Brazilian Cerrado. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. 2015.
- MARTINS, N. et al. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**. 74 (2015) 648–670.
- MENDES C.E.; FLACH A.; COSTA L.A.M.; DENARDIN R.B.; MOURA N.F. Efeitos das condições ambientais sobre o teor e variabilidade dos óleos voláteis de *Dalbergia frutescens* (Vell.) Britton (Fabaceae). **Quim. Nova**. Vol. 35, No. 9, 1787-1793, 2012.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. v. 26 n. 2, p. 211-219, 2004.
- MORATO, J. R.; XICOTA, L.; FITO, M.; FARRE, M.; DIERSSEN, M.; TORRE, R. Potential Role of Olive Oil Phenolic Compounds in the Prevention of Neurodegenerative Diseases. **Molecules**. 2015, 20, 4655-4680.
- NASCIMENTO, V. T.; VASCONCELOS, M. A. S.; MACIEL, M. I. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Famine Foods of Brazil's Seasonal Dry Forests: Ethnobotanical and Nutritional Aspects. **Economic Botany**. 66(1), 2012, pp. 22–34.
- NASCIMENTO, J.; MELO, A. F.; LIMA E SILVA, T. C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. M. estudo fitoquímico e ensaio toxicológico frente a larva de *Artemia salina* leach. De três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus*. **Revista Ciencia Farmacéutica Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2. P. 145-150, 2008
- NETO, L. G.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**. Vol. 30, No. 2, 374-381, 2007.

OLIVEIRA-JUNIOR, R. G. et al. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant and photoprotective activities of extracts from flowers of *Bromelia laciniosa* (Bromeliaceae). **Biotechnology & Biotechnological Equipment**. 2017 V. 31, N. 3, 600–605.

OLIVEIRA, R. C. et al. Population genetic structure of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): The role of pollination vs. seed dispersal and evolutionary implication. **AMERICAN JOURNAL OF BOTANY**. 104 (6): 1 – 11, 2017.

OLIVEIRA - JUNIOR, R. G. et al. The first flavonoid isolated from *Bromelia laciniosa* (Bromeliaceae). **Journal of Medicinal Plant Research**. Vol. 8(14), pp. 558-563, 10 April, 2014.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.** v.17, n.1, p.36-44, 2015.

OLIVEIRA – JUNIOR, R. G. et al. Development and Evaluation of Photoprotective O/W Emulsions Containing Hydroalcoholic Extract of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **The ScientificWorld Journal**. 2017.

OLIVEIRA – JUNIOR, R. G. et al. Dried extracts of *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae) present antioxidant and photoprotective activities in vitro. **Journal of Young Pharmacists**. 5, (2013), 102 -105.

OSORIO, M. N.; MOYANO, D. F.; MURILLO, W.; MURILLO, E.; IBARZ, A.; SOLANILLA, J. F. Functional and Rheological Properties of Piñuela (*Bromelia karatas*) in Two Ripening Stages. **International Journal of Food Engineering**. 2017.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 2. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

PEIXOTO, R. M.; SILVA, W. E. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; BRANCO, A.; COSTA, M. M. Antibacterial potential of native plants from the caatinga biome against *Staphylococcus* spp. isolates from small ruminants with mastitis. **Rev. Caatinga**. v. 29, n. 3, p. 758 – 763, jul. – set., 2016.

PERES, L. E. P. Metabolismo secundário. Disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf> Acesso em: 10/02/2011. PÔRTO, K. C.;

PEREZ, D. A.; LOPEZ, N. L.; GRIJALBA, E. P. G.; HEREDIA, J. B. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Food & Agriculture**. (2016), 2:1131412.

PIIRONEN, V.; LINDSAY, D. G.; MIETINEN, T. A.; TOIVO, J., LAMPI, A. M. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 80:939 – 966, (2000).

PRADO, J. P. C.; LONDONO, D. M. M.; ALMEIDA, V.; BRUNETTO, G.; PESCADOR, R. Physiological characteristics of the Atlantic Forest native bromeliads: *Nidularium campo-alegrense* Leme and *Aechmea ornata* Baker. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. v. 36, n. 1, p. 101-108, Jan.-Mar., 2014.

PROSPITTI, A.; CANCELARICH, L. N.; PERRANDO, J.; NATALUCCI, C. L.; PARDO, M. F. Balansain R, a New Proteolytic Preparation for the Production of Antioxidant Peptides from Bovine Whey. **Latin American Journal of Pharmacy**. 34, (7): 1387-95 (2015).

QUEIROZ, J. A.; QUIRINO, Z. G. M.; LOPES, A. V.; MACHADO, I. C. Vertebrate mixed pollination system in *Encholirium spectabile*: A bromeliad pollinated by bats, opossum and hummingbirds in a tropical dry forest. **Journal of Arid Environments**. 125, (2016), 21 – 30.

RAFIA, B. Phytosterols in Human Nutrition. **International Journal of Scientific Research and Reviews**. 2013, 2(2), 01- 10.

RAMALHO, M.; BATISTA, M. A.; SILVA, M. *Xylocopa (Monoxylocopa) abbreviata* Hurd & Moure (Hymenoptera: Apidae) e *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): Uma Associação Estreita no Semi-Árido do Brasil Tropical. **Neotropical Entomology**. 33, (4):417-425 (2004).

RAMÍREZ, C. A. D.; ESTRADA, R. M. Ciliate species from tank-less bromeliads in a dry tropical forest and their geographical distribution in the Neotropics. **Zootaxa**.4497 (2): 241–257.

RIBEIRO, M. F. Determinação simultânea de fitoesteróis e compostos fenólicos em folhas de *Ipomoea batatas* (L.) lam. cultivadas para produção industrial de etanol. 2016. Dissertação (Mestrado em Agroenergia) – Universidade Federal de Tocantins, Palmas, 2016.

Rivera, S. M. E.; CETTO, A. A.; VILLASENOR, G. S. Phytochemical Composition and Chronic Hypoglycemic Effect of *Bromelia karatas* on STZ-NA-Induced Diabetic Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2019.

ROCKENBACH, A. P.; RIZZARDI, M. A.; NUNES, A. L.; BIANCHI, M. A.; CAVERZAN, A.; SCHNEIDER, T. Interferência entre plantas daninhas e a cultura: alterações no metabolismo secundário. **Revista Brasileira de Herbicidas**. v.17, n.1, p.59-70, jan./mar. 2018.

RUIZ, J. C. R.; SIERRA, J. R.; ARGAEZ, C. A.; ORTIZ, D. M.; VAZQUEZ, E. O.

Antibacterial activity of proteins extracted from the pulp of wild edible fruit of *Bromelia pinguin* L. **International Journal of Food Properties**. v. 20, NO. 1, 220–230.

RICARDO, S. D. F.; COE, H. H. E.; DIAS, R. R.; SOUSA, L. O. F.; GOMES, E. Reference collection of plant phytoliths from the Caatinga biome, Northeast Brazil. **Flora**. 249 (2018) 1–8.

SANTOS, R.I. Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da Universidade, p.333-365. 2002.

SHAN, B.; CAI, Y.; BROOKS, J. D.; CORKE, H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, v. 117, p. 112–119, 2007.

SARAIVA, S. R. G. L.; SILVA, J. C.; BRANCO, C. R. C.; BRANCO, A. AMORIN, E. L.C.; ALMEIDA, J. R. G. S. Antinociceptive effect of *Encholirium spectabile*: A Bromeliaceae from the Brazilian caatinga biome. **Pharmacognosy Magazine**. v,10 , 2013.

SARAIVA, S. R. G. L. et al. Antinociceptive Properties and Acute Toxicity of Ethanol Extract of *Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult. f. (Bromeliaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. 2014; 13 (10): 1659-1666.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010.

SILVA, F. C.; RIBEIRO, R. C.; CHAVES, A. C. L. Radicais livres e antioxidantes: concepções e expectativas dos professores do ensino médio. In: VII Encontro Nacional de Pesquisa em Ensino de Ciências, 2009, Florianópolis. Anais do VII Encontro Nacional de Pesquisas em Educação em Ciências, Florianópolis, 2009, p. 1-12.

SHULTE, K.; HORRES, R.; ZIZKA, G. Molecular phylogeny of Bromelioideae and its implications on biogeography and the evolution of CAM in the family. **Senckenbergiana biologica**. 2005.

SILVA, F. S.; SARAIVA, D. P.; MONTEIRO, R. F.; PITA, P. MANTOVANI, A.; FORZZA, R. C. Invasion of the South American dry diagonal: What can the leaf anatomy of *Pitcairnioideae* (Bromeliaceae) tell us about it?. **Flora**. 2013.

SILVA, V. F.; FRANCO, I.; DAMASCENO, T. E. F.; ALMEIDA, J. R. G. S.; COSTA, M. M. Potencial antimicrobiano de extratos etanólicos de plantas frente a bacilos gram negativos isolados da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas

criadas na região de Petrolina-PE. **Semina: Ciências Agrária**. v. 35, n. 2, p. 883-890, mar./abr. 2014.

SILVA, C. P.; LEAL, B. S. S.; CHAVES, C. J. N.; FAY, M. F. Advances in and perspectives on evolution in Bromeliaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 2016, 181, 305–322.

SILVA, J. F.; SILVA – JUNIOR, A. A.; ZUCOLOTTI, S. M.; PREDROSA, S. M. M. Medicinal Plants for the Treatment of Local Tissue Damage. Induced by Snake Venoms: An Overview from Traditional Use to Pharmacological Evidence. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**. 2017.

SINGH, A. A. et al. Biotechnological aspects of plants metabolites in the treatment of ulcer: A new prospective. **Biotechnology Reports**. 2018.
SIXEL, P. J; PECINALLI, N. R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Infarma**, v.16, nº 13-14, 2005.

SOBRATTE, M. A., NEERGHEEN, V. S.; RAMMA, A. L.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**. 579 (2005) 200–213.

SOUZA, E. H. MASSARIALI, A. P.; MORENO, I. A. M.; SOUZA, F. V. D.; LEDO, C. A. S.; ALENCAR, S. M.; MARTINELLI, A. P. Volatile compounds profile of Bromeliaceae flowers. **Rev. Biol. Trop**. Vol. 64 (3): 1101-1116, September 2016.

SULTANA, N.; ATA, A. Oleanolic acid and related derivatives as 01medicinally important compounds. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. December 2008; 23(6): 739–756.

TODESCHINI, C. C.; Development, characterization, and transferability of SSR markers for *Vriesea carinata* (Bromeliaceae) based on RNA sequencing. **Applications in Plant Sciences**. 2018. 2018 6(10): e1184.

VALLÉS, D.; CANTERA, A. M. B. Antiacanthain A: New proteases isolated from *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **International Journal of Biological Macromolecules**. 113 (2018) 916–923.

ZARATE, Y. R.; MONDRAGON, D. Bromelias epífitas del distrito de Zaachila, Oaxaca, México. **Revista Mexicana de Biodiversidad**. 2016.

ZENNI, R. D. The naturalized flora of Brazil: a step towards identifying future invasive non-native species. **Rodriguésia**. 66(4): 1137-1144. 2015.