



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS- MACAÉ
CURSO DE FARMÁCIA



“INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE DE EXTRATOS DE *Humiria balsamifera* FRENTE À
PATÓGENOS HOSPITALARES:
ESTUDO PARA VALORIZAÇÃO DE UMA ESPÉCIE DA RESTINGA DE JURUBATIBA”

JÉSSYCA FERNANDES DE OLIVEIRA

Macaé
Fevereiro de 2013

JÉSSYCA FERNANDES DE OLIVEIRA

Título: “Investigação da atividade de extratos de *Humiria balsamifera* frente à patógenos hospitalares: estudo para valorização de uma espécie da Restinga de Jurubatiba.”

Monografia Apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico.

Orientadora: Profa. Dra. Ivana Correa Ramos Leal

Co-orientadora: Profa. Dra. Michelle Frazão Muzitano

Macaé
Fevereiro de 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

De Oliveira, Jéssyca Fernandes.

Investigação da atividade de extratos de *Humiria balsamifera* frente à patógenos hospitalares: estudo para valorização de uma espécie da Restinga de Jurubatiba / Jéssyca Fernandes de Oliveira – Rio de Janeiro: UFRJ / Macaé, 2013.

Orientadores: Ivana Correa Ramos Leal
Michelle Frazão Muzitano

Trabalho de Conclusão de Curso UFRJ / Macaé – Faculdade de Farmácia, 2013.

Referências bibliográficas:f. 45-51

1. Atividade antibacteriana, 2. *Humiria balsamifera*, 3. Restinga de Jurubatiba, 4. *Staphylococcus* sp., 5.Triterpenos

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE DE EXTRATOS DE *Humiria balsamifera* FRENTE
À PATÓGENOS HOSPITALARES: ESTUDO PARA VALORIZAÇÃO DE UMA
ESPÉCIE DA RESTINGA DE JURUBATIBA

Jéssyca Fernandes de Oliveira

Orientadores: Ivana Correa Ramos Leal
Michelle Frazão Muzitano

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de farmacêutico.

Aprovada por:

Presidente, Prof.^a Dra. Ivana Correa Ramos Leal

Prof.^a Dra. Ivana Correa Ramos Leal

Prof.^a Dra. Denise Oliveira Guimarães

Prof. Ivaldo Itabaiana Junior

Macaé / Fevereiro 2013

Confia no Senhor de todo teu coração e
não te estribes no teu próprio
conhecimento. (Pv 3.5)

Dedico este trabalho à minha mãe pelo cuidado, incentivo e companheirismo durante esta caminhada, ao meu irmão pela preocupação e apoio para que este projeto se realizasse, e ao meu noivo pela sua paciência, palavras de sabedoria e por seu amor que me fortaleceu para prosseguir.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço à Deus por ter me fortificado e capacitado para cada dia desta caminhada. Obrigada Senhor, eu nada seria sem a Tua presença e misericórdia na minha vida;
- Aos meus pais pelo incentivo e dedicação para que este sonho se tornasse realidade;
- À minha mãe, exemplo de determinação e perseverança, pelo seu apoio e pelos dias que assistiu TV no mudo ou dormiu com a luz acesa para que pudéssemos ficar mais juntas. Irmão, agradeço seus conselhos e suas atitudes, verdadeiramente preocupadas e amorosas. Amo vocês!
- Ao meu noivo, benção na minha vida, pelas suas palavras de sabedoria que me impulsionaram e deram coragem; por estar sempre cuidando de mim; pela sua paciência e companheirismo nos dias difíceis. Amor, obrigada pelos abraços e sorrisos que me ajudaram a chegar até aqui. Sou muito grata à Deus pela benção de estar ao seu lado. Te amo!
- À família do meu noivo por seus gestos de amor e exemplos de vida com Deus. Família que amo e admiro cada dia mais. Agradeço a Deus por poder fazer parte desta família, por compartilhar sorrisos, abraços, palavras e orações;
- Ao meu pastor e pastora por seus ensinamentos e por intercederem pela minha vida;
- À minha orientadora por seu empenho e preocupação com minha formação científica; por sua compreensão nas épocas difíceis da faculdade, e mais, por sua paciência;

- Aos mestres da Universidade Federal do Rio de Janeiro por me permitirem chegar ao final desta graduação com a certeza de ser um profissional qualificado e capacitado;
- Às amigas, Irma e Hellen, por me permitirem fazer parte de suas vidas compartilhando momentos felizes e tristes. Vocês foram muito importantes para essa conquista!
- À minha co-orientadora e aos integrantes do Lapron pela importante colaboração no desenvolvimento deste trabalho;
- Aos doutorandos Flávia de Abreu Carvalho e Ivaldo Itabaiana Júnior pelo auxílio nas análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- Ao Professor Rodrigo O. M. A. De Souza pela disponibilidade da utilização do Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica;
- Pelo NPPN pelas análises de RMN;
- À FUNEMAC pela bolsa de Iniciação Científica;
- À FAPERJ pela bolsa de Iniciação Científica.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Distribuição dos 10 principais patógenos causadores de infecções da corrente sanguínea (ICS), pneumonia, e infecções da pele e tecidos moles (SSTI) em pacientes internados (N) em centros médicos Latino-Americanos participantes do Programa de Vigilância Antimicrobial SENTRY(2008-2010).(Fonte: GALES *et al.*, 2012).4
- Figura 2** - Foto da espécie vegetal *Humiria balsamifera* (Restinga de Jurubatiba, Por: Ivana Leal, 2011).9
- Figura 3** - Rota de biosíntese dos terpenos (Adaptado de DOS SANTOS, 2010) ... 15
- Figura 4** - Esquema do processo de partição líquido-líquido a partir do extrato bruto de *H. balsamifera*.2121
- Figura 5** - Esquema do método de diluição em ágar Müller-Hinton para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) bacteriana.....23
- Figura 6** - Percentual de inibição das amostras bacterianas pelos extratos e frações da espécie vegetal *H. balsamifera*.32
- Figura 7** - Percentual de inibição do EBF e frações de *H.balsamifera* frente às amostras bacterianas clínicas isoladas de sítios de infecção hospitalar33
- Figura 8** - Resultados obtidos pelo método de diluição em ágar para a fração HXA- representação esquemática da leitura em placa após crescimento por 24h à 37°C.33
- Figura 9** - Cromatograma da fração hexânica obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).....36
- Figura 10** - CCD de sub-frações obtidas do processo de fracionamento em coluna de sílica da fração HXA.36
- Figura 11** - Cromatograma da sub-fração N.º 90 obtida do processo de fracionamento em coluna de sílica da fração HXA.....37
- Figura 12** - Espectros de massas obtidos a partir da técnica de CG-EM referentes às substâncias presentes na sub-fração N.º 90 com tempos de retenção de 33,14 (A) e 34,17 (B) minutos37
- Figura 13** - Principais fragmentos obtidos por espectrometria de massas para os triterpenos α - e β -amirina.38
- Figura 14** - Cromatogramas das sub-frações (65-71) e (72-79) obtidas do processo de fracionamento em coluna de sílica da fração HXA.....39

Figura 15 - Espectros de massas obtidos a partir da técnica de CG-EM referentes às substâncias presentes nas sub-frações (65-71) e (72-79) com tempos de retenção de 37,34 (A) e 37,31 (B) min, respectivamente.....	39
Figura 16 - Fragmentos típicos do esqueleto triterpênico friedelina obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	40
Figura 17 - RMN- ¹ H da sub-fração N.º 05 em CDCl ₃ (400 MHz).....	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Substâncias já isoladas a partir dos galhos e folhas da espécie vegetal <i>Humiria balsamifera</i>	11
Quadro 2 - Dados da coluna cromatográfica da fração hexânica.....	24
Quadro 3 - Fases móveis utilizadas para o fracionamento cromatográfico da fração hexânica e as correspondentes sub-frações obtidas	25
Quadro 4A - Perfil e total de bactérias inibidas pelos extratos brutos de <i>H. balsamifera</i>	30
Quadro 4B - Perfil e total de bactérias inibidas pelas frações e decoto de <i>H. balsamifera</i>	31
Quadro 5 - Perfil e total de inibição das amostras clínicas coletadas de diferentes sítios de infecção hospitalar de pacientes internados no Hospital Universitário da UFRJ	33

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Perfil das amostras bacterianas de referência ATCC avaliadas no presente estudo.....22
- Tabela 2** - Perfil das amostras bacterianas clínicas avaliadas no presente estudo. .22
- Tabela 3** - Rendimentos dos materiais vegetais secos e dos extratos brutos de *H. balsamifera*.....28
- Tabela 4** - Rendimentos em %p/p das frações obtidas do extrato burto de *Humiria balsamifera*.....29

LISTA DE ABREVIACOES

AcOEt	<i>Acetato de Etila</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ACN	<i>Acetonitrila</i>
APT	<i>¹³C Attached-Proton-Test</i>
AQ	<i>Aquosa</i>
BUOH	<i>Butanólica</i>
CCD	<i>Cromatografia em Camada Delgada</i>
CG-EM	<i>Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	<i>Concentrao Mnima Inibitria</i>
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
DCL	<i>Diclorometano</i>
DCLE	<i>Diclorometano Espumosa</i>
DCT	<i>Decocto</i>
DPPH	<i>2,2-Difenil-1-picril-hidrazila</i>
EBC	<i>Extrato bruto do Caule</i>
EBF	<i>Extrato Bruto da Folha</i>
EBFr	<i>Extrato Bruto da Folha Residual</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
HXA	<i>Hexnica</i>
H ₂ O:EtOH	<i>gua: Etanol</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
IMPPG	<i>Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Ges.</i>
INS	<i>Insolvel</i>
LaProN	<i>Laboratrio de Produtos Naturais</i>
MEOH	<i>Metanol</i>
MEOH:H ₂ O	<i>Metanol:gua</i>

NUPEM	<i>Núcleo de Pesquisa Ecológica de Macaé</i>
RMN- ¹ H	<i>Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio</i>
RMN- ¹³ C	<i>Ressonância Magnética Nuclear de Carbono</i>
T _R	<i>Tempo de Retenção</i>
UFC	<i>Unidades Formadoras de Colônia</i>
UTI	<i>Unidade de Tratamento Intensivo</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 PLANTAS MEDICINAIS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	1
1.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA	2
1.2.1 Panorama dos Principais Patógenos Causadores de Infecções Hospitalares no Brasil e América Latina.....	3
1.3 RESTINGA DE JURUBATIBA: ASPECTOS GERAIS.....	6
1.4 FAMÍLIA HUMIRIACEAE	7
1.4.1 Aspectos Químicos e Farmacológicos.....	7
1.5 O GÊNERO <i>Humiria</i>	9
1.6 A ESPÉCIE <i>Humiria balsamifera</i> E SEUS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.	10
1.7 TERPENOS: ASPECTOS GERAIS E BIOSINTÉTICOS	14
1.7.1 Terpenos: Aspectos Biológicos Gerais	16
1.7.2 Terpenos e Atividade Antibacteriana	16
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVOS GERAIS	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 COLETA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	20
4.1.1 Coleta e Identificação	20
4.1.2 Obtenção do Extrato Bruto, Decocto e Partições.....	20
4.1.2.1 Extrato Bruto Etanólico	20
4.1.2.2 Obtenção do Decocto	20
4.1.2.3 Partição Líquido-Líquido	21
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS	21
4.2.1 Amostras Bacterianas.....	21
4.2.2 Método de Diluição em Agar Müller-Hinton (NCCLS, 2008)	23
4.3 FRACIONAMENTO QUÍMICO BIOMONITORADO	24
4.3.1 Isolamento dos Constituintes Químicos da Fração Hexânica Ativa	24
4.3.1.1 Preparo da Fase Estacionária	24
4.3.1.2 Preparo da Fase Móvel	24
4.3.1.3 Análise da Pureza por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) ..	26

4.4 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS FRAÇÕES PURIFICADAS	26
4.4.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)	26
4.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹ H e ¹³ C.	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 RENDIMENTOS TOTAIS.....	28
5.1.1 Rendimento do Decocto.....	28
5.2. RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO PROCESSO DE PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS	28
5.3. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	29
5.4. ISOLAMENTO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DA FRAÇÃO HEXÂNICA.....	35
5.4.1 Análises Cromatográficas da Fração Hexânica	35
5.4.2 Análises Cromatográficas das Sub-frações da Fração Hexânica	36
5.4.3 Elucidação Estrutural da Sub-fração N.º 05.....	41
6. CONCLUSÃO	43
7. BIBLIOGRAFIA	45
8. ANEXOS	52
ANEXO 1 - ESPECTRO APT DA SUB-FRAÇÃO N.º 05.....	53
ANEXO 2 - ESPECTRO APT CORRELACIONADO COM O RMN - ¹ H DA SUB-FRAÇÃO N.º 05.....	54
ANEXO 3 - ESPECTRO HSQC DA SUB-FRAÇÃO N.º 05	55
ANEXO 4 - ESPECTRO HMBC DA SUB-FRAÇÃO N.º 05.....	56

RESUMO

DE OLIVEIRA, Jéssyca Fernandes. **Investigação da Atividade de Extratos de *Humiria balsamifera* frente à Patógenos Hospitalares: Estudo para Valorização de uma Espécie da Restinga de Jurubatiba.** Rio de Janeiro, 2013. Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia – Campus Prof. Aloísio Teixeira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

O reconhecimento da medicina convencional quanto ao uso de derivados de plantas é cada vez maior, pois diversos patógenos têm apresentado resistência frente aos antimicrobianos utilizados clinicamente. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antibacteriana de extratos da espécie vegetal *Humiria balsamifera* utilizando bactérias isoladas de sítios de infecções hospitalares e promover o isolamento biomonitorado dos constituintes bioativos. Folhas e caules de *H. balsamifera* coletadas na Restinga de Jurubatiba foram submetidas à maceração em etanol à temperatura ambiente. O extrato bruto da folha (EBF) mais ativo foi submetido à partição líquido-líquido com *n*-hexano (HXA), diclorometano (DCL), acetato de etila, (AcOEt) butanol (BUOH) e água (AQ). Todos os extratos e frações foram avaliados à 128, 256 e 512 µg/mL frente a 32 bactérias, dentre elas, amostras de referência ATCC e clínicas. A fração AQ inibiu 1 bactéria (*Acinetobacter baumannii*) à 128 µg/mL, enquanto os demais não apresentaram atividade nesta concentração. À 256 µg/mL apenas o EBF e as frações AQ e AcOEt foram ativos, inibindo 2, 1, 2 amostras, respectivamente. A fração AQ mostrou a melhor atividade à 512 µg/mL, inibindo 14 bactérias. Nesta concentração, a fração em AcOEt, HXA, DCL, BUOH e o decocto inibiram 9, 6, 4, 1 e 1 bactéria(s), respectivamente, enquanto o EBF inibiu 7. Entre as bactérias inibidas pela fração HXA encontram-se *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter spp*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. A análise por cromatografia em camada fina da fração HXA utilizando anisaldeído sulfúrico sugeriu a presença de esqueletos terpenícos, classe química já descrita para *H. balsamifera*. A identificação foi confirmada por CG-EM, que revelou a presença de derivados triterpênicos, como os do tipo friedelan-3-ona, como majoritários. A HXA foi purificada por cromatografia em coluna tendo sido obtidas 390 sub-frações que foram reunidas por semelhança no comportamento cromatográfico e, posteriormente, analisadas por CG-EM, que indicou a presença de α - e β -amirina e friedelina. As substâncias purificadas foram ainda submetidas a análises por RMN-¹H e -¹³C, HSQC, HMBC e COSY, que sugeriram a presença de um esqueleto terpenoidal em uma das frações. Os resultados alcançados são promissores e descrevem pela primeira vez a atividade antibacteriana de extratos de *H. balsamifera* frente à patógenos hospitalares.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana, *Humiria balsamifera*, Restinga de Jurubatiba, *Staphylococcus* sp., triterpenos.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, Jéssyca Fernandes. ***Humiria balsamifera* Extracts Investigation Against Nosocomial Pathogens: A Study for the Valorization of a Specie from Restinga de Jurubatiba.** Rio de Janeiro, 2013. Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia- Campus Prof. Aloísio Teixeira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2013.

The admission of conventional medicine considering the use of plant-derived drugs is growing since many pathogens have shown resistance against the current clinical antibiotics. Therefore, the goal of this study was to promote the antibacterial activity evaluation of *Humiria balsamifera* extracts by using bacteria clinical isolates from nosocomial infections sites and, a bioguide fractionation study. Leafs and stem from *H. Balsamifera* collected in Restinga of Jurubatiba were subjected to maceration in ethanol at room temperature. The leaf crude extract (LCE), more active, was submitted to a liquid-liquid partition with *n*-hexanes (HXA), dichloromethane (DCL), ethyl acetate (EtAc), buthanol (BUOH) and water (AQ). All extracts and fractions were evaluated at 128, 256 and 512 µg / mL against 32 ATCC and clinical isolated bacteria strains. The AQ fraction inhibited 1 bacteria (*Acinetobacter baumannii*) at 128 µg / mL, while the others showed no activity at this concentration. At 256 µg / mL just the LCE, AQ and EtAc fractions were active, inhibiting 2, 1, 2 samples, respectively. The AQ fraction showed the highest activity at 512 µg / mL, inhibiting 14 bacteria. At this concentration, the fractions EtAc, HXA, DCL, BUOH and decoct inhibited 9, 6, 4, 1 and 1 bacteria, respectively, while the LCE inhibited 7. Among the bacteria inhibited by HXA are *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp and *Enterococcus faecalis*. The thin layer chromatography analysis of the HXA fraction using sulfuric anisaldehyde suggested the presence of terpene skeletons, a chemical class already described for *H. balsamifera*. The identification was confirmed by GC-MS which showed the presence of triterpene type derivatives, such as friedelan-3-one, as major compounds. The HXA was purified by column chromatography being obtained 390 sub-fractions that were assembled for similarity in their chromatographic profile and, analyzed by GC-MS, which indicated the presence of α- and β-amyrin and friedelin. The purified substances were also examined by ¹H- and ¹³C-NMR, HSQC, HMBC and COSY, suggesting the presence of a terpenoidal skeleton in one of the sub-fractions. The results are promising and describe for the first time the antibacterial activity of *H. balsamifera* extracts against nosocomial pathogens.

Keywords: Antibacterial activity, *Humiria balsamifera*, Restinga de Jurubatiba, *Staphylococcus* sp., triterpenes.

1. INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

O emprego de plantas com atividades terapêuticas na prevenção, tratamento ou cura de doenças é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade (VOLPATO, 2005). Nas últimas décadas, a pesquisa por novos agentes anti-infecciosos tem sido foco de muitos grupos de pesquisa (RÍOS e RECIO, 2005) e, os produtos naturais têm obtido um incrível sucesso em servir como fonte para a descoberta de novos medicamentos antibacterianos (BIBI *et al.*, 2011).

Muitas plantas são reconhecidas na literatura por apresentar importante atividade antibacteriana. Algumas destas plantas são relatadas na revisão de Cowan (1999) exibindo atividade inibitória frente a diferentes espécies bacterianas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e outras. Entre estas espécies vegetais ativas estão a *Medicago sativa*, *Aloe barbadensis*, *Aloe vera*, *Euphorbia tirucalli*, *Piper nigrum*, *Matricaria chamomilla*, *Capsicum annum*, *Erythroxylum coca*, *Vicia faba*, *Eucalyptus globulus*, *Panax notoginseng*, *Lawsonia inermis*, *Camellia sinensis*, *Calendula officinalis*, *Anemone pulsatilla*, entre outras.

Em estudo realizado por De Lima *et al.* (2006) no qual foi avaliada a atividade antibacteriana de plantas utilizadas na medicina tradicional brasileira, demonstrou-se que o óleo de copaíba (obtido comercialmente) derivado de *Copaifera spp.* e extratos alcoólicos obtidos a partir das seguintes partes do vegetal: rizoma da *Jatropha elliptica*, cascas do caule de *Schinus terebinthifolius* e *Erythrina mulungu*, caules e folhas de *Caesalpinia pyramidalis* e *Serjania lethalis*, e cascas do caule e folhas de *Lafoensia pacari*, representam importantes fontes de agentes antibacterianos contra *S.aureus* sensíveis e/ou resistentes. É importante destacar que algumas destas plantas ou produtos, como por exemplo, *Schinus terebinthifolius*, *Lafoensia pacari* e o óleo de copaíba, já são comercializados na forma de fitoterápicos no Brasil.

A medicina convencional tem mostrado cada vez mais o interesse pelo uso de derivados de plantas, já que diversos patógenos têm apresentado resistência frente aos antimicrobianos utilizados clinicamente (LEWIS *et al.*, 2000). O aumento da prevalência da resistência bacteriana a antibióticos, principalmente associados com

a extensa utilização de agentes antimicrobianos, pode resultar numa matriz de substâncias insuficiente para combater algumas infecções bacterianas (HOERLLE e BRANDELLI, 2009), tornando-se necessária uma busca contínua pela comunidade científica por novas alternativas de tratamento contra estas infecções.

1.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA

O aumento da resistência antimicrobiana entre patógenos nosocomiais e adquiridos na comunidade é reconhecida em todo o mundo (SADER *et al.*, 2004). A resistência de bactérias patogênicas a antimicrobianos foi detectada há décadas e o surgimento cada vez mais frequente de cepas resistentes a múltiplas drogas (MDR), tanto em cepas bacterianas Gram-negativas quanto Gram-positivas, tem caracterizado um grande perigo de saúde pública, uma vez que muitas infecções causadas por estas cepas são quase intratáveis (DUBEY e PADHY, 2012).

Há evidências de que o consumo excessivo de antimicrobianos seja um fator crítico na seleção de cepas resistentes. Porém, a sub-utilização por dosagem inadequada, a não aderência ao tratamento, e a baixa qualidade dos antimicrobianos pode desempenhar um papel tão importante quanto o excesso de uso, levando à resistência (ROSSI, 2011). O uso indiscriminado dos fármacos é um fator relevante e que merece destaque no que diz respeito à pressão seletiva exercida sobre os micro-organismos. O comprometimento do sistema imunológico também é um agravante no combate à resistência aos micro-organismos, visto que, a ausência de um sistema de defesa capaz de superar o processo de infecção bacteriana tende a selecionar cepas com maior capacidade de sobrevivência (HARBARTH e SAMORE, 2005). A resistência antimicrobiana também está associada à evolução dos seres vivos através da recombinação e transmissão de genes de resistência, e a mutação espontânea, as quais promovem variabilidade genética entre os micro-organismos (SOUZA *et al.*, 1998).

Diferentes mecanismos de resistência podem ser encontrados para as espécies bacterianas. O organismo pode adquirir, por exemplo, genes que codificam enzimas, como as lactamases, que destroem o agente terapêutico antes que este possa ter efeito. As bactérias podem também adquirir bombas de efluxo que expulsam o agente antibacteriano da célula antes que este possa chegar ao seu local de ação e produzir efeito. E ainda as bactérias podem adquirir genes que

produzam alterações nas paredes celulares bacterianas, não expondo sítios de ligação ao agente antimicrobiano, ou adquirindo mutações que limitem o acesso de agentes antimicrobianos ao sítio-alvo intracelular pela supressão dos genes codificadores das porinas (TENOVER, 2006).

Bactérias multirresistentes têm sido cada vez mais frequentes em hospitais do mundo inteiro (NNIS, 2004), incluindo o Brasil, principalmente em unidades de tratamento intensivo (UTI). O alto consumo de medicamentos de último recurso, ocorrente quando cepas apresentam resistência à quase todos os antibióticos disponíveis, é frequente nas UTIs do Brasil. Muitas vezes também, o atraso nos relatórios de microbiologia dos hospitais pode prejudicar a prescrição de um antibiótico específico, contribuindo para um aumento da resistência devido a grande pressão por uso de antibióticos de amplo espectro. Além disso, o Brasil não tem um laboratório de microbiologia central de referência havendo carência de publicações oficiais (ROSSI, 2011).

1.2.1 Panorama dos Principais Patógenos Causadores de Infecções Hospitalares no Brasil e América Latina

De acordo com Rossi (2011) o aumento da prevalência da resistência antimicrobiana é uma preocupação global. Porém, o Brasil e países da América Latina em geral, têm níveis mais elevados de resistência bacteriana entre a maioria dos patógenos importantes, em comparação com a Europa e os Estados Unidos. Isto ocorre, particularmente, entre bacilos gram-negativos não-fermentadores e *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro ampliado, mas também entre organismos gram-positivos como o *Staphylococcus aureus*.

O *S. aureus* é um coco gram-positivo responsável por aproximadamente 20% das infecções nosocomiais primárias da corrente sanguínea, estando em primeiro lugar entre os patógenos causadores de infecções de pele e tecidos moles e, o segundo patógeno mais encontrado em pacientes com infecção do trato respiratório, segundo estudo realizado em centros médicos da América Latina (**Figura 1**) (GALES *et al.*, 2012).

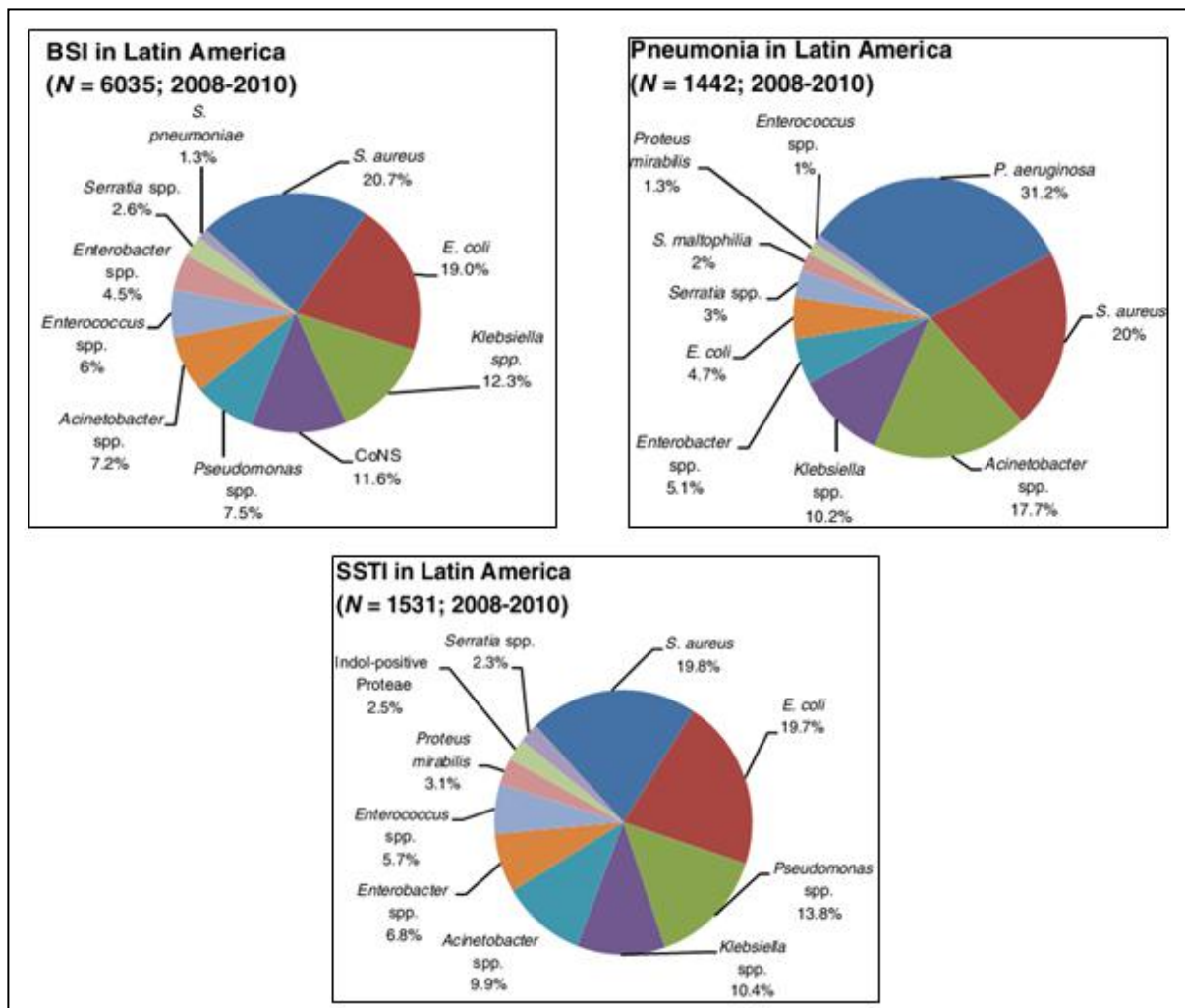


Figura 1 - Distribuição dos 10 principais patógenos causadores de infecções da corrente sanguínea (BSI), pneumonia, e infecções da pele e tecidos moles (SSTI) em pacientes internados (N) em centros médicos Latino-Americanos participantes do Programa de Vigilância Antimicrobial SENTRY(2008-2010).(Fonte: GALES *et al.*, 2012).

O *S. aureus* é um importante patógeno humano, e o desenvolvimento de resistência aos antibióticos tem imposto um desafio aos médicos (MARCINAK e FRANK, 2003). A partir do surgimento dos clones de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) um grave problema de saúde pública global se iniciou. Vários clones MRSA já foram identificados em todo o mundo, e apesar de um destes clones ter sido descrito como originado no Brasil, a epidemiologia molecular do clone MRSA na América Latina ainda está em grande parte desconhecida. A maioria dos clones MRSA que circulam na América Latina estão relacionados com os cinco principais clones de *S.aureus* resistentes à meticilina, a saber: NYJ (Nova Iorque/Japão), pediátrico, Brasileiro, Ibérico, e Húngaro. No Brasil, o primeiro clone MRSA surgiu

em 1990, sendo já identificados entre 1996 – 1998 clones com resistência heterogênia a vancomicina e teicoplanina (RODRÍGUEZ-NORIEGA *et al.*, 2010).

Pseudomonas aeruginosa multirresistente é também uma das principais causas de infecções nosocomiais em muitas UTIs brasileiras, ficando em primeiro lugar como causa de pneumonia nosocomial, sendo responsável por cerca de 31% destas infecções e, em terceiro lugar, entre os patógenos causadores de infecções de pele e tecidos moles em estudo realizado em centros médicos da América Latina (**Figura 1**) (GALES *et al.*, 2012). A resistência antimicrobiana entre amostras de *P. aeruginosa* em países latino-americanos tem aumentado significativamente ao longo de um período de tempo relativamente curto (ANDRADE *et al.*, 2003). Altas taxas de resistência aos carbapenêmicos foram relatadas entre os isolados, o que é resultante da disseminação de um clone epidêmico designado clone SP e também, do surgimento de cepas resistentes devido à pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos (ROSSI, 2011).

Espécies do gênero *Acinetobacter*, bactérias Gram-negativas, também possuem grande representatividade no panorama das infecções hospitalares. Estes foram os terceiros patógenos mais encontrados em pacientes com infecção do trato respiratório, atingindo aproximadamente 18% dos pacientes, com 9% para as infecções de pele e tecidos moles (**Figura 1**) (GALES *et al.*, 2012). As amostras do complexo *A. baumannii* surgiram como importantes patógenos nosocomiais, causando pneumonia associada à ventilação, bacteremia, infecção do trato urinário e outras infecções relacionadas a grandes surtos em UTIs brasileiras desde 1996. Este complexo exibiu ainda, uma capacidade muito grande para adquirir novos determinantes de mecanismos de resistência (ROSSI, 2011).

A família Enterobacteriaceae compreende uma lista longa de bactérias Gram-negativas, e dentre elas, algumas desenvolveram o mecanismo de resistência pela produção de β -lactamases de espectro ampliado. No estudo de Gales *et al.* (2012), 24,7% e 52,7% das espécies de *E. coli* e *Klebsiella spp.*, respectivamente, exibiram o fenótipo ESBL (*Extended-spectrum β -lactamase producer*) de acordo com o critério epidemiológico CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) para ESBL. As maiores taxas de fenótipo ESBL entre cepas de *E. coli* foram observadas para amostras coletadas do México (48,4%), seguido pelo Chile (23,8%), Argentina (18,1%) e Brasil (12,8%). Em contraste, entre cepas de *Klebsiella spp.*, as taxas de

fenótipo ESBL foram maiores na Argentina (60,4%), seguido pelo Chile (59,2%), Brasil (49,9), e México (33,3%).

Considerando a relevância dos referidos patógenos como importantes causadores de infecções hospitalares e, os produtos naturais como fontes alternativas de obtenção de novos constituintes bioativos, esse trabalho propõe a investigação de uma espécie vegetal ocorrente na Restinga de Jurubatiba. A diversidade das condições físicas desta região dá origem a uma grande variedade de habitats, os quais são colonizadas por comunidades vegetais também bastante diversificadas (ARAÚJO e LACERDA 1987, *apud* KELECOM *et al.*, 2002, p.271), com uma riqueza e complexidade estrutural promissora, o que justifica a escolha de espécies desta região para nossos estudos.

1.3 RESTINGA DE JURUBATIBA: ASPECTOS GERAIS

O termo restinga, ecologicamente, refere-se ao mosaico de formações vegetais (herbáceas, arbustivas, arbóreas) encontradas na planície litorânea arenosa de idade quaternária (SCARANO, 2002). A Restinga de Jurubatiba, localizada na região Norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, abrange as planícies fluviais e marinha do litoral dos municípios de Quissamã, Carapebus e Macaé. Compreende uma faixa de orla marítima com 14.860 Ha de área e 44 Km de extensão ao longo da praia, com cerca de 2 km de largura na extremidade oeste, ao lado da lagoa Cabiúnas e 4,8 km de largura na extremidade leste (canal de Ubatuba), com um perímetro de 123 km. O Parque abrange formações vegetais que variam desde a praia (formação rastejante), passando por arbustos esparsos, áreas permanentemente ou periodicamente alagadas, até as florestas altas nos locais mais distantes do mar. Portanto, a restinga apresenta uma flora consideravelmente variada, podendo representar uma importante fonte de substâncias com potenciais atividades terapêuticas (PDDSQ, 2006). O clima desta região varia de quente a chuvoso no verão, até seco no inverno, a temperatura média oscila de 22 à 24°C e as precipitações anuais variam entre 1.000 a 1.350 mm (KELECOM *et al.*, 2002).

No Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba já foram registradas 618 espécies vasculares, que estão distribuídas em 381 gêneros e 120 famílias (ARAÚJO *et al.*, 2000 *apud* KELECOM *et al.*, 2002, p.174). Dentre as famílias de espécies vegetais que compõem a restinga encontram-se as famílias Astearaceae,

Myrtaceae, Rubiaceae, Bromeliaceae e Humiriaceae, da qual pertence a espécie *Humiria balsamifera* (KELECOM, *et al.*, 2002).

1.4 FAMÍLIA HUMIRIACEAE

A família Humiriaceae pertence à classe das angiospermas, compreendendo 8 gêneros e 35 espécies de acordo com a lista de espécies da flora do Brasil de 2012. No Brasil, podem ser encontradas no Norte (Roraima, Amapá, Pará, Amazonas, Tocantins, Acre, Rondônia), Nordeste (Maranhão, Ceará, Pernambuco, Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Santa Catarina). Os gêneros que compõem esta família são *Duckesia* Cuatrec., *Endopleura* Cuatrec., *Humiria* A.St.-Hil., *Humirastrum* (Urb.) Cuatrec., *Hylocarpa* Cuatrec., *Sacoglottis* Mart., *Schistostemon* (Urb.) Cuatrec., *Vantanea* Aubl. (AMORIM e MEDEIROS, 2012).

1.4.1 Aspectos Químicos e Farmacológicos

Poucos membros desta família tem sido estudados quanto ao aspecto químico, entre eles estão *Vantanea peruviana* J.F. Macbr onde foram identificados flavonoides (NOREEN *et al.*, 1998 apud DA SILVA *et al.*, 2004, p.94) e *Sacoglottis gabonensis* (Baillon) Urb e *S. uchi* Huber de onde se isolou das cascas a bergenina (**Quadro 1**), uma isocumarina (OGAN, 1971; DE ABREU *et al.*, 2008; PATEL *et al.* 2012). Outro exemplo é a *Endopleura uchi* (Wuber) da qual foram identificados, a partir do estudo químico da polpa, 42 constituintes voláteis. Estes consistiam essencialmente dos compostos alcoólicos 3,3-dimetil-2-butanol (18,8%), eugenol (14,0%), bem como metil e etil ésteres de ácidos graxos (18,5%) (MARX *et al.*, 2002). A partir das cascas desta espécie também foi isolada a bergenina (NUNOMURA *et al.*, 2009).

De acordo com levantamentos bibliográficos, constituintes presentes em espécies pertencentes à família Humiriaceae já foram descritos por desempenharem importantes atividades farmacológicas. A bergenina, isolada do extrato EtOH:H₂O 70% do caule da espécie *Vantanea peruviana*, demonstrou forte inibição da enzima COX-1 em modelo *in vitro*. Em estudo *in vivo* a bergenina mostrou significante

atividade inibitória sobre o edema de orelha de rato induzido por fenilpropionato de etila. É importante destacar que a espécie *V. peruviana* já vem sendo utilizada na medicina indígena por tribos peruvianas para o tratamento de várias doenças relacionadas à inflamação (DUNSTAN *et al.*, 1997).

O chá das cascas da espécie *Endopleura uchi* também é utilizado na medicina tradicional da Amazônia como agente anti-inflamatório, efeito este que pode ser atribuído também à presença do metabólito bergenina, encontrada em quantidade significativa nas cascas. Esta substância mostrou ação inibitória sobre a enzima COX-2 (NUNOMURA *et al.*, 2009) em modelos onde se avaliou os níveis de prostaglandina E2. A fração em acetato de etila obtida das cascas da *E. uchi* também exibiu atividade antifúngica contra as espécies *Candida albicans* (CMI= 19,6 µg/mL), *C. tropicalis* (CMI= 39,2 µg/mL) e *C. guilliermondii* (CMI= 19,6 µg/mL) o que corrobora cientificamente o uso tradicional desta espécie contra infecções que afetam o aparelho reprodutor feminino (DA SILVA *et al.*, 2009). Vale ressaltar que esta ação encontra-se diretamente relacionada à concentração de bergenina nas cascas desta espécie. Extratos das cascas de *E. uchi* também são descritos na literatura por desempenharem função antioxidante significativa pelo método colorimétrico do radical livre DPPH, o qual avalia a capacidade do extrato em reduzir o radical estável pela doação de H• (POLITI *et al.*, 2011).

O extrato aquoso das cascas da espécie *Sacoglottis gabonenses* exibiu atividade anti-helmíntica tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*. No estudo *in vitro*, o extrato reduziu de forma significativa a eclosão de ovos de nematoides em pequenos ruminantes naturalmente infectados. Em ratos experimentalmente infectados com *Heligmosomoides polygyrus*, o tratamento com o extrato aquoso da casca de *S. gabonenses* reduziu significativamente a carga de vermes adultos e inibiu totalmente a eliminação de ovos nas fezes após 5 dias de tratamento (NWOSU *et al.*, 2008). O extrato H₂O:EtOH 4% das cascas de *S. gabonenses* também exibiu atividade antioxidante contra a peroxidação de membrana tanto por mecanismos enzimáticos, inibindo a ação da catalase e aumentando a ação da enzima superóxido desmutase, como não enzimáticos, poupando a depleção de vitaminas C e E (MADUKA e OKOYE, 2002). Outra espécie deste mesmo gênero, a *S. Uchi*, apresentou importante atividade antioxidante e é utilizada popularmente para o tratamento de doenças hepáticas. Esta atividade parece ter sido atribuída à presença da

substância química bergenina isolada do extrato metanólico desta espécie e já identificada como uma excelente substância antioxidante (DE ABREU *et al.*, 2008).

1.5 O GÊNERO *Humiria*

O gênero *Humiria* compreende 3 espécies: *Humiria balsamifera* (Aubl.) J.St.-Hil., *Humiria crassifolia* Mart. ex Urb. e *Humiria wurdackii* Cuatrec. de acordo com a lista de espécies da flora do Brasil de 2012 (AMORIM e MEDEIROS, 2012).

As espécies *H. crassifolia* Mart. ex Urb. e *H. wurdackii* Cuatrec são nativas do Amazonas, e não apresentam variedades. A espécie *H. balsamifera* (Aubl.) J.St.-Hil (**Figura 2**), estudada na presente pesquisa, é nativa das regiões Norte (Roraima, Amapá, Pará, Amazonas, Tocantins), Nordeste (Maranhão, Pernambuco, Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás), Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro), e possui 9 variedades: *H. balsamifera* var. *coriacea* Cuatrec., *H. balsamifera* var. *floribunda* (Mart.) Cuatrec., *H. balsamifera* var. *guianensis* (Benth) Cuatrec., *H. balsamifera* var. *laurina* (Urb.) Cuatrec., *H. balsamifera* var. *minarum* Cuatrec., *H. balsamifera* var. *parvifolia* (Juss.) Cuatrec., *H. balsamifera* var. *savannarum* (Gleason), *H. balsamifera* var. *stenocarpa*, *H. balsamifera* var. *subsessilis* (Urb.) (AMORIM e MEDEIROS, 2012).



Figura 2 - Foto da espécie vegetal *Humiria balsamifera* (Restinga de Jurubatiba, Por: Ivana Leal, 2011).

1.6 A ESPÉCIE *Humiria balsamifera* E SEUS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

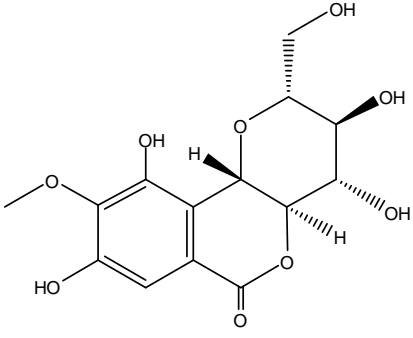
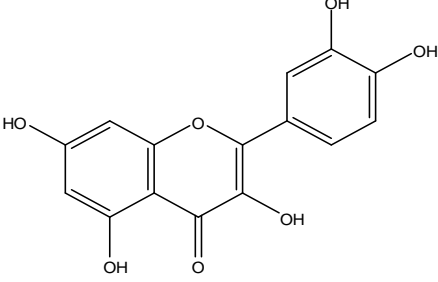
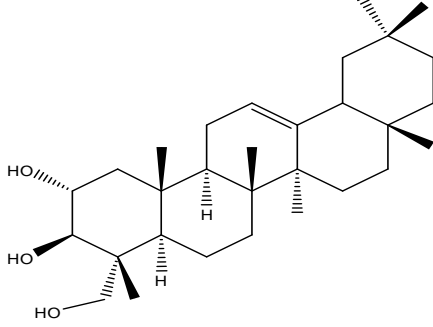
A espécie *Humiria balsamifera* St. Hill (Humiriaceae) é também conhecida como “uniri-de-cheiro”, “umiri-do-pará”, “umirizeiro”, “umiri” e “muréua” (LORENZI e MATOS, 2008). Esta planta é utilizada popularmente na Amazônia como perfume e no tratamento de doenças como hepatite, diarreia e hemorroidas (COELHO-FERREIRA, 2009). Estudos descrevem ainda a ação anti-helmíntica, expectorante, cicatrizante, contra dor de dente e na cura de feridas crônicas (LORENZI e MATOS, 2008). Quanto aos aspectos químicos, já foi descrita na literatura o isolamento de alguns constituintes a partir dos galhos e folhas desta espécie, a saber: seis triterpenos, um flavonol (quercetina), uma isocumarina (bergenina), um diterpeno (fitol), e dois fitoesteroides (sitosterol e estigmasterol). Além disso, também foi relatada a presença de três sesquiterpenos, identificados como óxido de cariofileno, epóxido de humuleno II e trans-isolongifolenona e, quatro ésteres alifáticos, a saber: metil-, tetra-, hexa- e octadecanoato, e etil tetradecanoato (**Quadro 1**) (DA SILVA *et al.*, 2004).

O triterpeno ácido arjunólico e a isocumarina bergenina, bem como as frações MeOH/H₂O, HEX, DCL e AcOEt obtidas do caule e folha de *H. Balsamifera*, foram avaliados quanto a atividade antimalárica em testes *in vitro* frente ao *Plasmodium falciparum* e, *in vivo*, em modelos de ratos infectados com *P. berghei*. Dentre as frações das folhas submetidas ao ensaio antimalárico *in vitro* as mais ativas foram aquelas em AcOEt e MeOH/H₂O, enquanto a fração DCL do caule se mostrou mais ativa frente à amostra de *P. falciparum* resistente à cloroquina. O ácido arjunólico mostrou atividade antimalárica moderada contra *P. falciparum* resistente, já a bergenina se revelou inativa frente à esta cepa e fracamente ativa contra *P. berghei* (DA SILVA *et al.*, 2004).

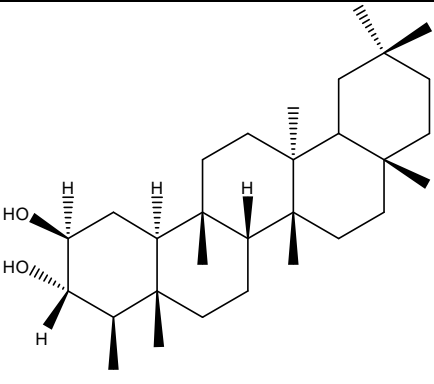
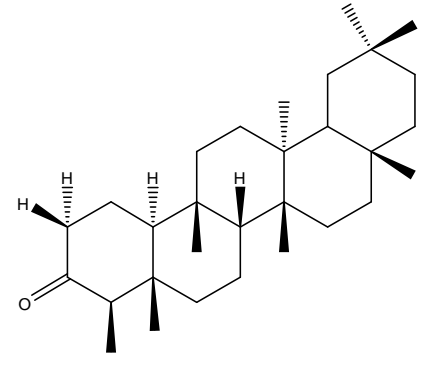
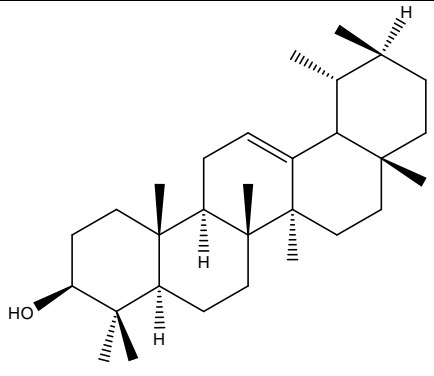
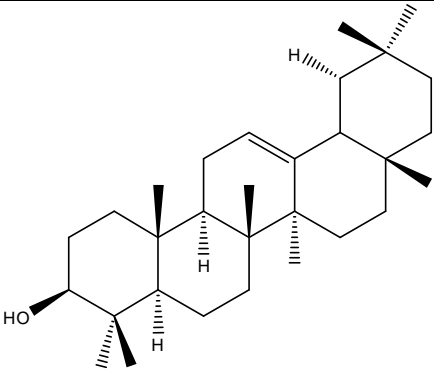
O sesquiterpeno trans-isolongifolenona, também tem se destacado por desempenhar diferentes atividades, como por exemplo, a inibição da tirosinase, enzima envolvida na síntese de melanina de plantas e animais (CHOUDHARY, 2003). A trans-isolongifolenona hidrogenada foi descrita ainda como importante componente no preparo de ligante quirais para o receptor de estrogênio que pode ser usado na regulação da fertilidade, menopausa e até no tratamento do câncer (MUTHYALA *et al.*, 2003). Além disso, a trans-isolongifolenona também está descrita na literatura por desempenhar atividade repelente contra duas espécies de

mosquitos, *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi*, e duas espécies de carrapato, *Ixodes scapularis* e *Amblyomma americanum*. Considerando esta atividade, foi concedida ao grupo de pesquisa uma patente relacionada à preparação e utilização da trans-isolongifolenona como repelente. Os derivados desta substância já vêm sendo utilizados em produtos cosméticos e o método de produção foi otimizado por este grupo uma vez que descreveram a síntese a partir do isolongifoleno e, não mais a partir do óleo de terebintina. Os autores supõem que a trans-isolongifolenona tem um potencial considerável como um repelente natural que pode ser disponibilizado em grande quantidade e de forma sustentável para a população. (ZHANG *et al.*, 2009).

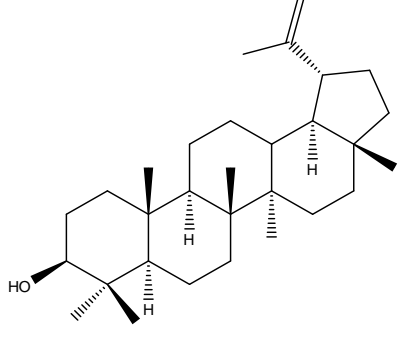
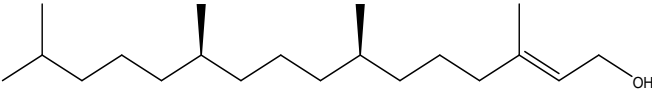
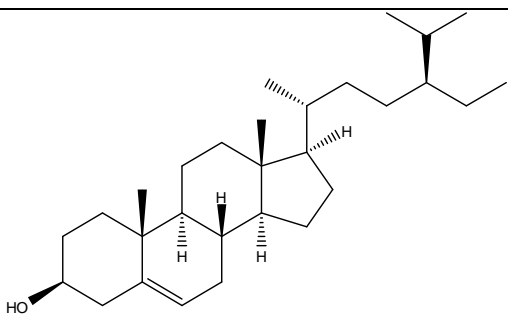
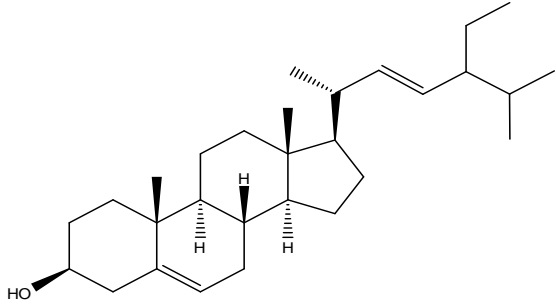
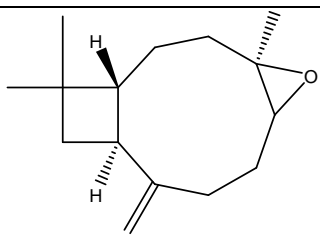
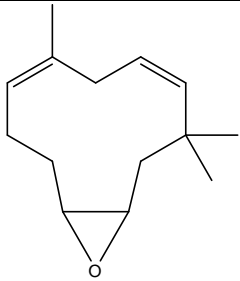
Quadro 1 – Substâncias já isoladas a partir dos galhos e folhas da espécie vegetal *Humiria balsamifera*

N°	ESTRUTURA QUÍMICA	NOMENCLATURA (CLASSE DO METABÓLITO)
01		Bergenina (Cumarina)
02		Quercetina (Flavonol)
03		Ácido Arjunólico (Triterpeno)

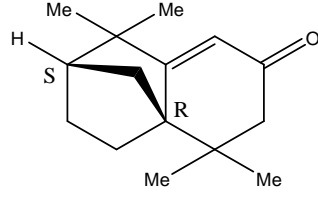
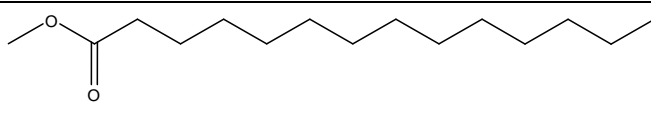
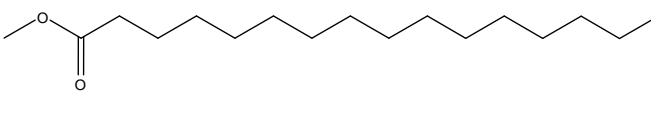
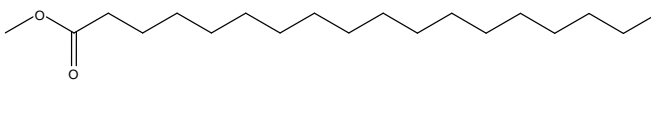
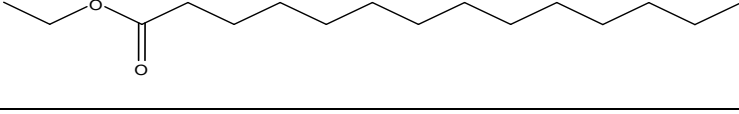
Quadro 1 (cont.) – Substâncias já isoladas a partir dos galhos e folhas da espécie vegetal *Humiria balsamifera*

04		2b,3a-dihidroxi-D:A friedooleanano (Triterpeno)
05		Friedelina (Triterpeno)
06		α -amirina (Triterpeno)
07		β -amirina (Triterpeno)

Quadro 1 (cont.) – Substâncias já isoladas a partir dos galhos e folhas da espécie vegetal *Humiria balsamifera*

08	 <p>The structure of Lupeol is a complex pentacyclic triterpene. It features a pentacyclic core with a hydroxyl group at C-3, a methyl group at C-13, and a side chain at C-14 consisting of a propyl group and a methyl group. The side chain is attached to a quaternary carbon that is also bonded to a methyl group and a vinyl group.</p>	Lupeol (Triterpeno)
09	 <p>The structure of Fitol is a linear diterpene. It consists of a long hydrocarbon chain with a terminal hydroxyl group and a double bond. The chain is substituted with several methyl groups and a side chain at the end.</p>	Fitol (Diterpeno)
10	 <p>The structure of Sitosterol is a steroid. It has a four-ring steroid nucleus with a hydroxyl group at C-3, a double bond at C-5, and a side chain at C-17. The side chain is a branched alkyl chain with a methyl group at C-14 and an ethyl group at C-15.</p>	Sitosterol (Fitoesteróide)
11	 <p>The structure of Estigmasterol is a steroid. It has a four-ring steroid nucleus with a hydroxyl group at C-3, a double bond at C-5, and a side chain at C-17. The side chain is a branched alkyl chain with a methyl group at C-14 and an ethyl group at C-15.</p>	Estigmasterol (Fitoesteróide)
12	 <p>The structure of Cariofileno oxide is a sesquiterpene. It is a bicyclic system with a ten-membered ring and a five-membered ring. It features a hydroxyl group, a methyl group, and a double bond.</p>	Óxido de Cariofileno (Sesquiterpeno)
13	 <p>The structure of Humuleno epoxide is a sesquiterpene. It is a bicyclic system with a ten-membered ring and a five-membered ring. It features a hydroxyl group, a methyl group, and a double bond.</p>	Epóxido de Humuleno (Sesquiterpeno)

Quadro 1 (cont.) – Substâncias já isoladas a partir dos galhos e folhas da espécie vegetal *Humiria balsamifera*

14		Trans-isolongifolenona (Sesquiterpeno)
15		Metil-tetra decanoato (Éster alifático)
16		Metil-hexa decanoato (Éster alifático)
17		Metil-octa decanoato (Éster alifático)
18		Etil-tetra decanoato

1.7 TERPENOS: ASPECTOS GERAIS E BIOSINTÉTICOS

Considerando a quantidade significativa de terpenos já isolados da espécie vegetal *H. balsamifera*, torna-se relevante a descrição geral deste metabólito secundário e sua relação com a atividade antibacteriana, o foco deste trabalho.

Metabólitos secundários são substâncias que embora não sejam necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagem para a sobrevivência e perpetuação da espécie em seu ecossistema. Os terpenos são metabólitos secundários produtos da via do mevalonato, substância formada pela condensação de uma unidade de acetoacetil-CoA com uma de acetil-CoA. Após a condensação aldólica, ocorre uma hidrólise formando a 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA que é reduzida a mevalonato, numa reação irreversível. O mevalonato é convertido em isopentil-pirofosfato, ou isopreno ativo, a unidade básica na formação dos terpenos. A molécula isopentil-pirofosfato com o seu isômero dimetilalil-pirofosfato formam o trans-geranil-pirofosfato, e a partir deste se formam os demais terpenos.

Ligações cabeça-cauda entre trans-geranil-pirofosfato e isopentil-pirofosfato formarão os sesquiterpenos (15C) e os diterpenos (20C), enquanto que ligações cabeça – cabeça entre duas moléculas de farnesil-pirofosfato (15C) levará a formação do esqualeno, caracterizado como precursor da maior parte dos triterpenos e esteroides (**Figura 3**) (DOS SANTOS, 2010). Os terpenos são classificados com base no número e organização estrutural dos carbonos formados pelo arranjo linear das unidades de isopreno e seguidos por ciclização e rearranjos do esqueleto de carbono com uma característica empírica conhecida como a regra de isopreno (DEVAPPA *et al.*, 2011).

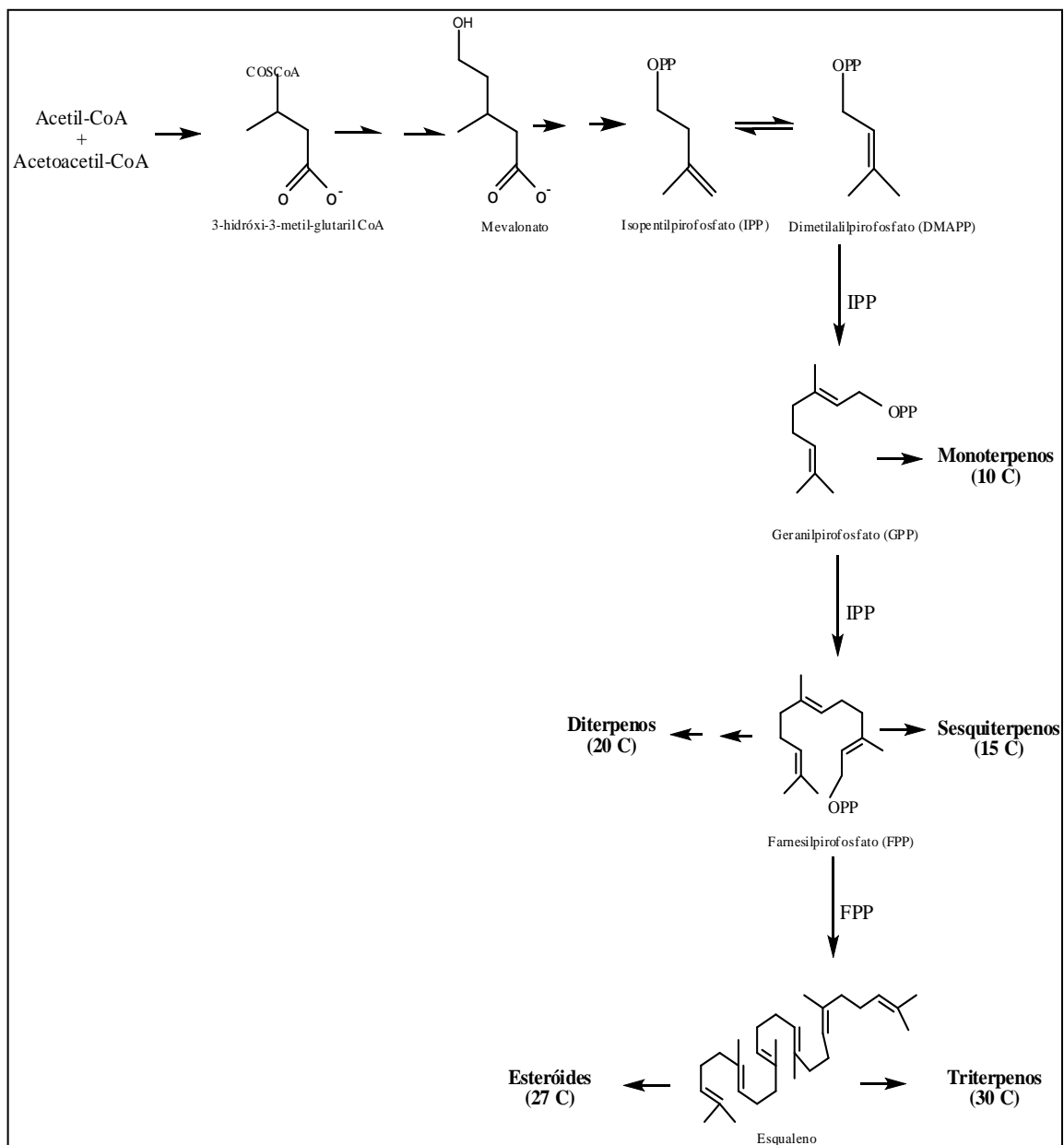


Figura 3 – Rota de biossíntese dos terpenos (Adaptado de DOS SANTOS, 2010)

1.7.1 Terpenos: Aspectos Biológicos Gerais

Terpenos são vitais para a vida na maioria dos organismos exercendo o controle metabólico e mediação das relações inter e intra-espécies, como por exemplo, a polinização e a defesa nas plantas. Além de produzirem estes compostos em resposta a herbívoros ou estresse, também tem sido demonstrado que as flores podem produzir terpenoides para atrair insetos polinizadores e até mesmo atrair ácaros benéficos que se alimentam de insetos herbívoros. Estas substâncias também podem atuar como mensageiros químicos que influenciam a expressão de genes envolvidos na função defensiva das plantas ou influenciar na expressão gênica das plantas vizinhas. Muitos terpenos são descritos ainda como toxinas, inibidores de crescimento ou repelente para micro-organismos e animais (DEVAPPA *et al.*, 2011).

1.7.2 Terpenos e Atividade Antibacteriana

Os terpenos possuem um alto grau de lipofilicidade (OLUWATUYI *et al.*, 2004), podendo, portanto, ser encontrados em frações com característica mais apolar, como a fração hexânica e/ou diclorometânica. Quanto aos aspectos farmacológicos, esta classe de metabólito apresenta muitas descrições na literatura, dentre elas quanto à atividade antibacteriana.

O artigo de revisão de Wang *et al.* (2012) corrobora a importância significativa de que os terpenos desempenham papel importante na busca de novas moléculas com atividade antibacteriana. Neste trabalho, os autores relatam o isolamento de terpenos com atividades biológicas, entre eles dois diterpenos com atividade antibacteriana frente ao *S. aureus*, o 16-hidroxiisopimar-8(14)-en-15-ona (CMI = 0,1 mg/mL) e o isopimar-8(14)-eno-15,16-diol (CMI = 0,5 mg/mL), isolados da espécie *Ceriops tagal*.

No artigo de revisão de Devappa *et al.* (2011) são descritos vários diterpenos isolados de espécies do gênero *Jatropha* que exibem atividade antibacteriana, entre eles estão japodagrone, japodagrone, jatrogenone, riolozatrione, 2-hidroxiisojatrogrossidione, 2-epihidroxiisojatrogrossidione, 2β-hidroxiijatrogenone, palmarumicina CP1, palmarumicina JC1, palmarumicina JC2, (4Z)-jatrogrossidentadione, (4z)- 15-epijatrogrossidentadione e jaherina.

De acordo com levantamentos bibliográficos é possível observar também muitas correlações na literatura entre triterpenos pentacíclicos e atividade antibacteriana. Dentre os muitos já descritos pode-se destacar o trabalho desenvolvido pelo presente grupo, onde os ácidos alfitólico e o éster metílico do ácido ceanotanólico, isolados da fração diclorometano das raspas da casca do caule de *Zizyphus joazeiro*, foram correlacionados a uma significativa atividade antibacteriana. Estes constituintes apresentaram CMI igual a 32 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente, frente a cepas clínicas hospitalares e de referência ATCC de *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes à oxacilina (LEAL *et al.*, 2010).

Também é de fundamental importância a atividade inibitória exibida pelos derivados dos triterpenos betulina, alobetulina e lupeol frente às espécies *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* (KRASUTSKY *et al.*, 2004). Os triterpenos pentacíclicos lupeol, ácido betulínico e ácido ursólico, isolados a partir da fração hexânica obtida das folhas de *Curtisia dentata* também estão indicados na literatura por exibir atividade antibacteriana frente a *E. faecalis*, *E. coli* e *S. aureus* (SHAI *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Com o crescimento do número de bactérias multirresistentes à diferentes antibióticos, várias enfermidades de origem infecciosa permanecem com terapêutica inadequada. Portanto, tornou-se indispensável a busca por novas substâncias com propriedades antibacterianas obtidas, dentre outras formas, a partir de fonte natural.

O estudo de espécies vegetais da Restinga de Jurubatiba pode representar uma importante alternativa como fonte de obtenção de novas moléculas bioativas, pois apresenta uma rica biodiversidade e espécies vegetais ainda pouco exploradas quanto ao potencial químico-farmacológico. Ela é composta por um bioma bastante diversificado o que favorece a produção de metabólitos de complexidades estruturais também bastante variados e que podem agir especificamente em receptores biológicos diversos.

A espécie *Humiria balsamifera* é ocorrente na Restinga de Jurubatiba e pertence a família Humiriaceae, da qual alguns gêneros já demonstraram importantes atividades biológicas, como: atividade anti-inflamatória, antifúngica, antioxidante e anti-helmíntica. Para a espécie *H. balsamifera* já foram atribuídas propriedades antimaláricas além do uso popular como cicatrizante, na cura de feridas crônicas, dor de dente e no tratamento da diarreia. Desta espécie, já foram isolados metabólitos de diferentes classes químicas, dentre elas, triterpenos pentacíclicos, os quais são marcadamente reconhecidos na literatura por apresentar relevante atividade antibacteriana.

Considerando a descrição sobre a presença de esqueletos terpênicos na espécie vegetal em investigação e, o efeito cicatrizante do extrato sob feridas, esta espécie mostra-se promissora quanto à atividade antibacteriana. Neste contexto, visa-se a busca quanto à capacidade inibitória dos extratos frente à diferentes espécies bacterianas causadoras de infecção e, o desenvolvimento de análises químicas que promovam a identificação dos grupos químicos responsáveis por essa atividade.

Por fim, a partir deste estudo foi possível a obtenção de maior conhecimento científico e conseqüente valorização de uma espécie vegetal ainda pouco estudada ocorrente na Restinga Norte-Fluminense no que se refere ao seu potencial químico e biológico.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a atividade antibacteriana de diferentes extratos da espécie vegetal *Humiria balsamifera* frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de referência e isoladas de sítios de infecção hospitalar e, promover um fracionamento químico biomonitorado a partir das frações ativas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos etanólicos brutos de folhas e caules de *H. balsamifera* a partir da técnica de maceração estática à temperatura ambiente;
- Preparar frações de diferentes polaridades, a partir do extrato bruto mais ativo, pela técnica de partição líquido-líquido;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos/frações frente a amostras bacterianas de referência e clínicas hospitalares, utilizando o método de diluição em ágar Mueller-Hinton (MH) para determinação da concentração mínima inibitória;
- Promover o rastreamento fitoquímico biomonitorado das frações ativas, utilizando-se métodos cromatográficos clássicos de separação, focando especialmente na triagem pelos triterpenos;
- Identificar estruturalmente as classes e os constituintes químicos majoritários presentes nas sub-frações ativas utilizando-se a técnica de cromatografia em camada fina e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, respectivamente;
- Identificar as substâncias isoladas através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-¹H) e Carbono mono (RMN-¹³C) e bidimensionais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

4.1.1 Coleta e Identificação

A espécie vegetal *Humiria balsamifera* foi coletada na Restinga de Jurubatiba no Município de Quissamã em novembro de 2010 e foi devidamente identificada pela Prof^a Dr^a Tatiana U. P. Konno, NUPEM- UFRJ / Macaé. A exsicata do material vegetal foi depositada sob o número de registro RFA33650 no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - UFRJ/ RJ.

O material vegetal foi devidamente separado em folhas e galhos e pesado, sendo posteriormente seco em estufa com circulação de ar (NOVA ÉTICA) por 24h à 45°C. O material seco obtido foi pulverizado em pulverizador (ARNO).

4.1.2 Obtenção do Extrato Bruto Etanólico, Decocto e Partições

4.1.2.1 Extrato Bruto Etanólico

As folhas (224 g) e caules (66,6 g) pulverizados foram submetidas a um processo de extração por maceração à temperatura ambiente em etanol absoluto (TEDIA[®]) por 7 dias, sendo o solvente renovado diariamente. O macerado obtido foi filtrado em papel de filtro e posteriormente concentrado em evaporador rotatório (BUCHI[®]), tendo sido os extratos etanólicos brutos quantificados.

4.1.2.2 Obtenção do Decocto

50 g das folhas frescas de *H. balsamifera* proveniente de uma segunda coleta foram fervidas com 2L de água filtrada durante 10 a 15 min. Posteriormente, este material foi transferido para um béquer com agitador magnético e submetido a extração em temperatura baixa (40 °C) por 30 min. O decocto obtido foi filtrado, congelado e por fim, liofilizado.

4.1.2.3 Partição Líquido-líquido

O extrato etanólico bruto das folhas (36,25 g) foi ressuspensão em 250 mL de solução CH₃OH:H₂O (9:1), sendo realizado uma partição líquido-líquido iniciando-se com hexano (4 x de 150 mL), seguido de diclorometano (4 x de 150 mL), acetato de etila (4 x 150 mL), butanol (5 x 150 mL), restando o resíduo aquoso (**Figura 4**).

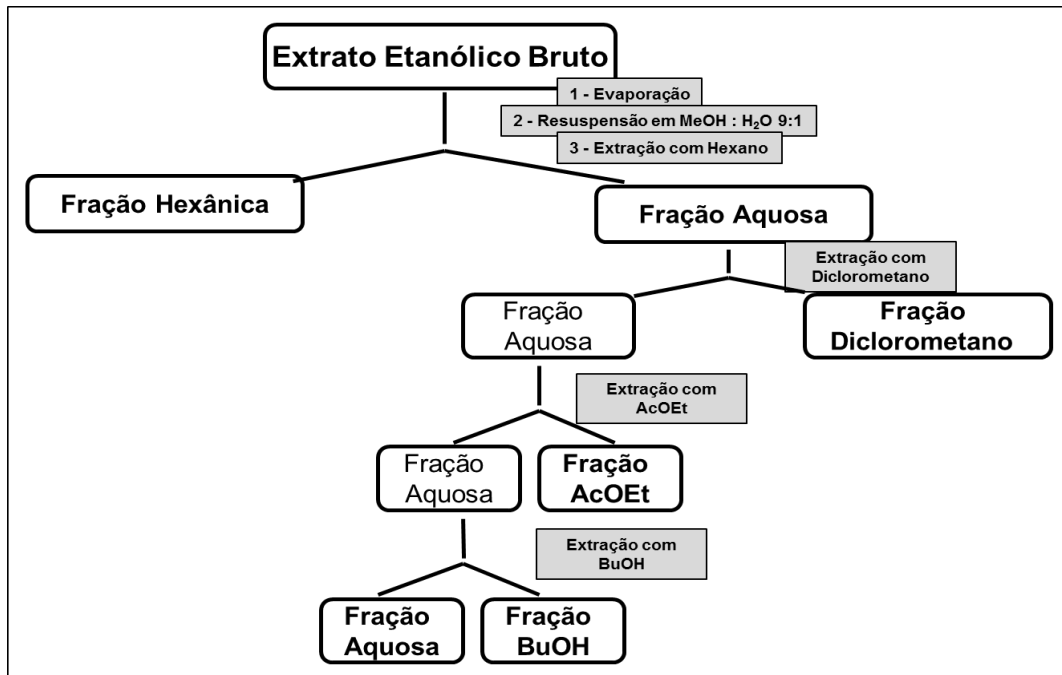


Figura 4 - Esquema do processo de partição líquido-líquido a partir do extrato bruto de *H. balsamifera*

4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS

4.2.1 Amostras Bacterianas

As amostras bacterianas utilizadas neste trabalho pertencem a coleção de culturas do Laboratório de Infecção Hospitalar do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG) – UFRJ e foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Kátia Regina N. dos Santos. As amostras clínicas de *S. aureus*, *Enterobacter* e *Acinetobacter* foram coletadas a partir de diferentes sítios de infecção hospitalar de pacientes internados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ/ RJ. Nas **tabelas 1 e 2** a seguir encontram-se as principais descrições das amostras ATCC e clínicas avaliadas, respectivamente.

Tabela 1 – Perfil das amostras bacterianas de referência ATCC avaliadas no presente estudo.

AMOSTRAS ATCC				
Bactéria (N=15 bactérias)	Perfil de Resistência	Fonte de Isolamento	Código da Amostra	Gram +/-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	Pele Humana	(ATCC 29970)	+
<i>S. cohnii</i>	-	Pele Humana	(ATCC 29974)	+
<i>S. warneri</i>	-	-	(ATCC 10209)	+
<i>S. epidermidis</i>	SO	-	(ATCC 12228)	+
<i>S. capitis</i>	-	Pele Humana	(ATCC 27840)	+
<i>S. aureus</i>	RO	-	(ATCC 33591)	+
<i>S. aureus</i>	SO	Ferida	(ATCC 29213)	+
<i>S. hominis</i>	-	Pele Humana	(ATCC 27844)	+
<i>S. simulans</i>	-	Pele Humana	(ATCC 27851)	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Urina	(ATCC 29212)	+
<i>E. faecalis</i>	RV	Fluido Peritonial	(ATCC 51299)	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	Urina	(ATCC 700603)	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	(ATCC 29009)	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	RI	-	(ATCC 48695)	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	(ATCC 25922)	-

RV – Resistente a Vancomicina / RI – Resistente ao Imipenem/ SO – Sensível à oxacilina

Tabela 2 – Perfil das amostras bacterianas clínicas avaliadas no presente estudo.

AMOSTRAS CLÍNICAS				
Bactéria (n = 17)	Perfil de Resistência	Fonte de Isolamento	Código da Amostra	Gram +/-
<i>S. aureus</i>	RO/RV	-	MU-50	+
<i>Enterobacter</i>	-	-	HON334	-
<i>A. baumannii</i>	RI	-	OXA 51	-
<i>S. aureus</i>	SO	Prótese	1025	+
<i>S. aureus</i>	SO	Prótese	1006	+
<i>S. aureus</i>	SO	Prótese	1015	+
<i>S. aureus</i>	RO	Prótese	1125	+
<i>S. aureus</i>	RO	Sangue	517	+
<i>S. aureus</i>	RO	Abcesso cutâneo	526	+
<i>S. aureus</i>	RO	Articulação	604	+
<i>S. aureus</i>	RO	Lavado broncoalveolar	527	+
<i>S. aureus</i>	RO	Ferida de pele	664	+
<i>S. aureus</i>	RO	Sangue	646	+
<i>S. aureus</i>	RO	Sangue	520	+
<i>S. aureus</i>	RO	Abcesso	601	+
<i>S. aureus</i>	RO	Ponta de catéter	551	+
<i>S. aureus</i>	RO	Sangue	529	+

RO - Resistente à oxacilina / SO – Sensível à oxacilina / RV – Resistente a Vancomicina / RI – Resistente ao Imipenem

4.2.2 Método de Diluição em Agar Müeller-Hinton (NCCLS, 2008)

Esta técnica tem como objetivo a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do extrato/fração em estudo capaz de impedir o crescimento do micro-organismo (**Figura 5**). Para tal, 40 mg do material vegetal foram pesados e diluídos em 3,9 mL de DMSO, obtendo uma solução final de 10256 µg/mL. Desta solução homogeneizada foram carreados 2 mL e transferidos para um tubo com 2 mL de água e assim sucessivamente. Assim, diluições seriadas (5120 e 2560 µg/mL) do material vegetal seco foram preparadas, respectivamente. Em seguida, um volume de 1mL das amostras vegetais nas três diferentes concentrações foram acrescentadas à 19 mL de meio de cultura, ainda em fusão, e transferidas para placas de Petri, alcançando as concentrações finais de 512, 256 e 128 µg/mL.

Colônias bacterianas crescidas previamente em ágar base foram transferidas para solução salina (0,9%) até atingir uma turvação comparada a escala 0,5 de McFarland (10^8 UFC/mL), e esta solução foi diluída 1:10 (v/v) em salina. A partir destas soluções bacterianas, 500 µl foram transferidos para os poços do replicador de Steers a fim de se carrear de 1-2 µl de cada solução para as placas contendo ágar Müeller-Hinton e o material vegetal em diferentes concentrações, resultando numa concentração final de 10^4 UFC/mL. A leitura dos resultados foi realizada após incubação em estufa por 24h à 37°C. O experimento foi realizado em triplicata, tendo sido apenas considerados os resultados que se confirmaram nos três ensaios.

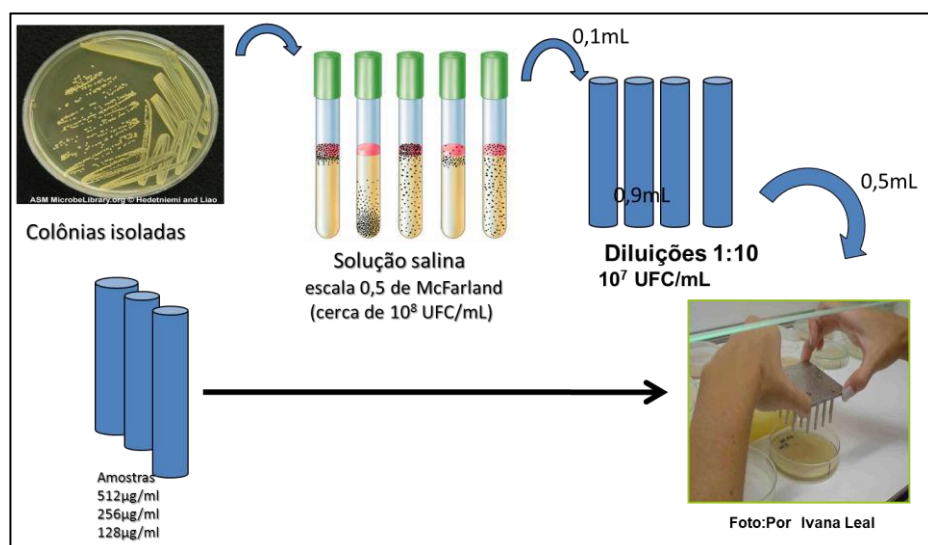


Figura 5 - Esquema do método de diluição em ágar Müeller-Hinton para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) bacteriana.

4.3 FRACIONAMENTO QUÍMICO BIOMONITORADO

4.3.1 Isolamento dos Constituintes Químicos da Fração Hexânica Ativa

4.3.1.1 Preparo da Fase Estacionária

Para o isolamento dos constituintes químicos majoritários do extrato hexânico ativo foi utilizada uma coluna cromatográfica de vidro utilizando-se fase normal constituída por GEL DE SÍLICA 60 (40-63 Micras) (SILICYCLE®) como fase estacionária.

Para o desenvolvimento do processo cromatográfico, a sílica foi ressuspensa em hexano e transferida cuidadosamente para a coluna de vidro a fim de se garantir um empacotamento adequado. Em seguida, 2,114 g do extrato hexânico foram ressuspensos em acetato de etila e à esta solução foi acrescida sílica gel. A mistura foi levada ao rota-evaporador até formação de uma pastilha fina e seca, a qual foi posteriormente aplicada na superfície da coluna com o auxílio de um funil de sólido. Os dados da coluna estão descritos no **quadro 2** a seguir:

Quadro 2 - Dados da coluna cromatográfica da fração hexânica

COLUNA CROMATOGRÁFICA- Sílica Gel	
Altura	60 cm
Diâmetro	3,4 cm
Altura da Fase Estacionária	44 cm
Altura da Pastilha	1 cm

4.3.1.2 Preparo da Fase Móvel

As fases móveis utilizadas no processo de cromatografia em coluna e as respectivas frações obtidas estão descritas no **quadro 3** a seguir. No total foram coletadas 390 frações, as quais foram monitoradas quanto ao perfil químico por cromatografia em camada delgada.

Quadro 3 - Fases móveis utilizadas para o fracionamento cromatográfico da fração hexânica e as correspondentes sub-frações obtidas

ELUENTE	FRAÇÕES	QTD. ELUENTE (mL)
HEXANO 100%	*01-07/ 1-10	650
HXA:DCL 10%	11-29	450
HXA:DCL 30%	30-50	500
HXA:DCL 50%	51-64	320
HXA:AcOEt 15%	65-75	250
HXA: AcOEt 20%	76-101	470
HXA: ACOEt30%	102-114	250
HXA: AcOEt 40%	115-126	250
HXA: AcOEt 50%	127-159	500
HXA: AcOEt 60%	160-188	500
HXA: AcOEt 70%	189-200	250
HXA: AcOEt 80%	201-213	250
HXA: AcOEt 90%	214-225	250
AcOEt 100%	226-244	400
AcOEt:MEOH 10%	245-269	500
AcOEt:MEOH 20%	270-282	250
AcOEt:MEOH 30%	283-294	250
AcOEt:MEOH 40%	295-306	250
AcOEt:MEOH 50%	307-318	250
AcOEt:MEOH 60%	319-330	250
AcOEt:MEOH 70%	331-342	250
AcOEt:MEOH 80%	343-353	250
AcOEt:MEOH 90%	354-366	250
METANOL 100%	367-390	500

HXA: Hexano/ AcOEt – Acetato de etila/ MEOH – Metanol

* 01/07 - Frações correspondentes às primeiras eluições logo após aplicação da fração hexânica na coluna.

4.3.1.3 Análise da Pureza por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As frações obtidas a partir do processo de fracionamento por cromatografia em coluna do extrato hexânico foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se sílica de fase normal em placa revestida de alumínio (GEL DE SÍLICA F254- SORBENT[®]). Como eluente, utilizou-se uma combinação dos solventes HXA: DCL e HXA: AcOEt (TEDIA[®]) em diferentes proporções até a obtenção de sistemas adequados para efetiva separação das substâncias nas placas cromatográficas, as quais foram reveladas com anisaldeído sulfúrico.

Anisaldeído Sulfúrico

O anisaldeído sulfúrico, à quente, apresenta prova positiva para cadeias esteroidais e terpênicas, sendo a apresentação de coloração arroxeadada estável indicativa para triterpenos. Este revelador apresenta ainda reação positiva para óleos essenciais, derivados de fenilpropanóides e derivados fenólicos (LEAL, 2007).

Composição:

Solução I: Solução a 5% de ácido sulfúrico (VETEC[®]). Em um balão volumétrico de 100 mL acrescentou-se 50 mL de água e, gota a gota, foram adicionados os 5 mL de ácido, SOB RESFRIAMENTO- com um banho de gelo- e, depois completou-se o volume até 100mL.

Solução II: Solução a 5% de anisaldeído (MERCK[®]) em etanol. Em um balão volumétrico de 100 mL acrescentou-se 50 mL de etanol e em seguida foram adicionados os 5 mL de anisaldeído, depois completou-se o volume até 100mL.

Quanto à forma de utilização, inicialmente a cromatoplaça foi borrifada com a solução I seguida de borrifação da solução II com posterior aquecimento e análise sob luz visível.

4.4 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS FRAÇÕES PURIFICADAS

4.4.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

As análises por CG/EM foram realizadas no Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica- IQ- UFRJ / RJ em um equipamento Shimadzu GC/EM2010.

A separação cromatográfica foi realizada em colunas capilares de sílica fundida RTx-5MS (30 m × 0,25 milímetros × 0,25 µm) da Restek Corporation (EUA).

A temperatura da coluna foi mantida a 60 °C durante 1 min e, em seguida, aumentada até 280 °C a 15 °C / min, e mantida durante 10 min. O gás de arraste utilizado foi o hélio (He) e o fluxo foi de 1,1 ml / min. A temperatura de injeção foi ajustada para 250 °C e a razão de separação foi 20. As temperaturas da fonte de ions e da interface foram 250 e 300 °C, respectivamente. As amostras foram transformados em derivados sililados mais voláteis, na presença de piridina e N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA). As amostras foram preparadas pela adição de 200 µL de MSTFA em 2 mg de extrato / fração. Após 15 minutos, a amostra foi dissolvida em 2 ml de clorofórmio e 1 µL desta amostra foi então injetada no equipamento com o auxílio do amostrador automático.

4.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C .

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN) mono e bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY, NOESY) das substâncias isoladas foram realizados no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais - UFRJ/ RJ.

Os espectros foram registrados em espectrômetro de 500 MHz VARIAN INOVA 500 (Probenköpfe für direkte Beobachtung de ^1H , ^{19}F , ^{15}N - 31P) ou no espectrômetro de 400 MHz VARIAN MERCURY-VX 400 4-Kern-Probenkopf (^1H , ^{19}F , ^{31}P , ^{13}C) automatischer Probenwechsler für 9 Proben. Os deslocamentos químicos (δ) foram referendados com padrões internos TMS ($\delta=0$, ^1H) sendo expressos em unidades ppm (parte por milhão) e, as constantes de acoplamento, (J), em Hertz (Hz).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN- ^{13}C) foram registrados nos aparelhos descritos acima nas frequências de absorção apropriadas e nos solventes indicados no espectro de cada amostra, utilizando-se TMS ou o próprio solvente, como o CDCl_3 ($\delta = 77.0$, ^{13}C) como referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em unidades ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTOS TOTAIS

Os extratos etanólicos brutos obtidos foram pesados a fim de se calcular as massas finais obtidas e os respectivos rendimentos. Na tabela abaixo estão dispostos os rendimentos do material vegetal seco e dos extratos brutos (**Tabela 3**),

Tabela 3 - Rendimentos dos materiais vegetais secos e dos extratos brutos de *H. balsamifera*

	Massa seca (g)	%p/p do material seco	Código dos Extratos	Massa (g)	%p/p dos extratos
Material vegetal Total	298,2	-	--	--	--
Folhas	224,0	75,12%	EBF	39,80	17,77%
Caule	66,6	22,33%	EBC	3,55	5,3%

5.1.1 Rendimento do Decocto

A partir de 50 g de folhas frescas de *H. balsamifera* foi obtido 4,2 g de decocto, que corresponde a 8,4% p/p.

5.2. RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO PROCESSO DE PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS

Por questões de miscibilidade de solventes, previamente ao início da partição líquido-líquido com o diclorometano (item 4.1.2.3) foi necessário retirar o metanol da fração hidroalcoólica e, a seguir, ressuspender todo o material em água. Nesta etapa, observou-se a formação de um precipitado com aspecto viscoso que persistiu ao adicionar o diclorometano, dando origem a fração insolúvel (INS). Foi observado ainda, na mistura $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ no funil de partição, a formação de uma fração com aspecto espumoso a qual tinha seu rendimento reduzido com a renovação do diclorometano. Na última etapa do processo de partição com diclorometano a

espuma residual foi separada, caracterizando a fração diclorometano espumosa (DCLE) (Tabela 4).

Tabela 4 - Rendimentos em %p/p das frações obtidas do extrato bruto de *Humiria balsamifera*.

FRAÇÕES DA FOLHA	CÓDIGOS	RENDIMENTO	%p/p
Extrato bruto das folhas	(EBF)	36,25 g	---
Hexânica	(HXA)	4,39g	12,11%
Diclorometano	(DCL)	0,38g	1,05%
Diclorometano espumosa	(DCLE)	0,35g	0,96%
Insolúvel	(INS)	8,67g	23,91%
Acetato de Etila	(AcOEt)	2,13g	5,88%
Butanólica	(BUOH)	3,41g	9,41%
Aquosa	(AQ)	4,00g	11,03%

Considerando a **tabela 4**, a fração insolúvel exibiu o melhor rendimento (23,91%), seguido da fração hexânica (12,11%). Porém, a fração insolúvel apresentou dificuldade de solubilização em DMSO e, nas demais misturas de solventes preparadas na tentativa de solubilizar esta fração.

Portanto, a fração hexânica foi a que obteve melhor rendimento dentre as frações passíveis de solubilização.

5.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Com o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana dos extratos brutos das folhas (EBF) e caule (EBC) e, das frações obtidas pelo processo de partição líquido-líquido, adotou-se o método de diluição em ágar Müller-Hinton que visa a determinação da concentração mínima inibitória.

Os extratos etanólicos brutos (EBF e EBC) foram testados nas concentrações de 128, 256 e 512 µg/mL frente à 32 bactérias (**Tabelas 1 e 2; item 4.2.1**), tendo os resultados mais expressivos sido observados na concentração de 512 µg/mL, como ilustra o **quadro 4A** a seguir.

Quadro 4A – Perfil e total de bactérias inibidas pelos extratos brutos de *H. balsamifera*.

EXTRATO	CONCENTRAÇÃO	BACTÉRIAS INIBIDAS	N° DE BACTÉRIAS
EBF	512 µg/mL	ATCC 27840, 29974, 10209, 12228, MU-50, ATCC 48695, ATCC 29970.	7
	256 µg/mL	ATCC 27840, ATCC 29974.	2
	128 µg/mL	-	0
EBC	512 µg/mL	ATCC 48695	1
	256 µg/mL	-	0
	128 µg/mL	-	0

- Amostras Clínicas

De acordo com os resultados observados (**Quadro 4A**), o extrato bruto da folha, à 512 µg/ mL, inibiu 7 do total de amostras testadas, enquanto o extrato bruto do caule inibiu apenas 1 das 32 amostras. Dentre as cepas inibidas pelo EBF nesta concentração encontram-se amostras ATCC e clínicas resistentes e sensíveis do gênero *Staphylococcus*, e amostras ATCC e clínica de *A. baumannii* resistentes ao imipenem. Isto justifica o EBF ter sido selecionado para posterior etapa de particionamento líquido-líquido com os demais solventes.

Todas as frações provenientes do EBF foram testadas nas concentrações de 128, 256 e 512 µg/mL frente às mesmas 32 bactérias (item 4.2.1), tendo os melhores resultados sido observados à 512 µg/mL, como ilustra o **quadro 4B** a seguir. Vale ressaltar que, dentre as frações obtidas pelo processo de partição do EBF, apenas as frações em diclorometano (DCL) nas concentrações de 128 e 256 µg/mL e, a fração diclorometano residual (DCLE), não foram utilizadas para o teste antibacteriano. Isto se justifica pelos baixos rendimentos obtidos para estas frações.

Quadro 4B – Perfil e total de bactérias inibidas pelas frações e decocto de *H. balsamifera*.

FRAÇÃO	CONCENTRAÇÃO	BACTÉRIAS INIBIDAS	Nº DE BACTÉRIAS
HXA	512 µg/mL	ATCC 33591, ATCC 27840, ATCC 29974, ATCC 12228, OXA51, MU-50.	6
	256 µg/mL	-	0
	128 µg/mL	-	0
DCL	512 µg/mL	ATCC 27840, 29974, 10209, 12228	4
AcOEt	512 µg/mL	ATCC 27840, ATCC 10209, ATCC12228, ATCC 48695, 1006, 1015, ATCC 27851, ATCC 29970, 517	9
	256 µg/mL	ATCC 27840, ATCC10209.	2
	128 µg/mL	-	0
BUOH	512 µg/mL	ATCC 48695	1
	256 µg/mL	-	0
	128 µg/mL	-	0
AQ	512 µg/mL	ATCC 27840, ATCC 29974, ATCC 10209, ATCC 12228, MU-50, ATCC 48695, 1006, 529, ATCC 29970, 1015, 517, 527, 520, 646	14
	256 µg/mL	ATCC 48695	1
	128 µg/mL	ATCC 48695	1
DCT	512 µg/mL	ATCC 48695	1
	256 µg/mL	-	0
	128 µg/mL	-	0
INS	512 µg/mL	-	0
	256 µg/mL	-	0
	128 µg/mL	-	0

- Amostras Clínicas

O extrato aquoso apresentou o melhor perfil de atividade uma vez que inibiu pelo ou menos 1 amostra (*A. baumannii* resistente ao imipenem) dentre as 32 bactérias testadas na menor concentração (128 µg/mL) avaliada. Os demais extratos não apresentaram atividade nesta concentração.

À 256 µg/mL apenas o EBF e, as frações AQ e AcOEt, apresentaram atividade inibitória frente a um total de 2, 1, 2 bactérias, respectivamente. Entre as espécies inibidas encontram-se *A. baumannii* resistente ao imipenem (sensível a AQ), e, as espécies *S. capitis*, *S. warneri* e *S. cohnii* (sensível ao EBF e AcOEt).

À 512 µg/mL o extrato aquoso mostrou a melhor atividade, inibindo 14 do total de amostras testadas (n=32), dentre elas amostras clínicas de *S. aureus* resistentes e sensíveis a oxacilina e, a cepa de referência de *A. baumannii* resistente ao imipenem (ATCC 48695). Nesta concentração, as frações em acetato de etila e hexânica também apresentaram importante atividade, inibindo um total de 9 e 6 bactérias, respectivamente, incluindo amostras clínicas de *S. aureus* resistentes e sensíveis a oxacilina, amostras de referência de *S. aureus* resistente a oxacilina e *S. epidermidis*. As frações em diclorometano, butanólico e o decocto mostraram atividade frente a um total de 4, 1 e 1 bactéria(s), respectivamente, exibindo, portanto, atividades menos significativas.

A partir da **figura 6** foi possível observar mais nitidamente a atividade inibitória exibida pelos extratos e frações à 512 µg/mL, destacando-se as melhores atividade para as frações AQ, AcOEt e HXA, que inibiram 43,75%; 28,13% e 18,75% do total de amostras, respectivamente.

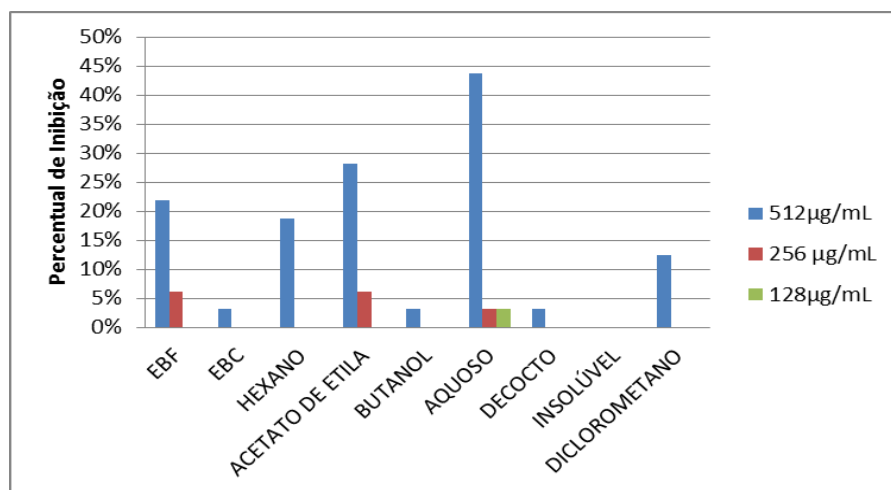


Figura 6 - Percentual de inibição das amostras bacterianas pelos extratos e frações da espécie vegetal *H. balsamifera*.

Vale ressaltar ainda que, considerando as 17 amostras clínicas hospitalares testadas, o seguinte extrato e frações: EBF, HXA, AcOEt e AQ mostraram-se ativos frente à 1 (5,9%), 2 (11,8%), 3 (17,6%) e 8 (47%) amostras, respectivamente (**Figura 7**) (**Quadro 5**).

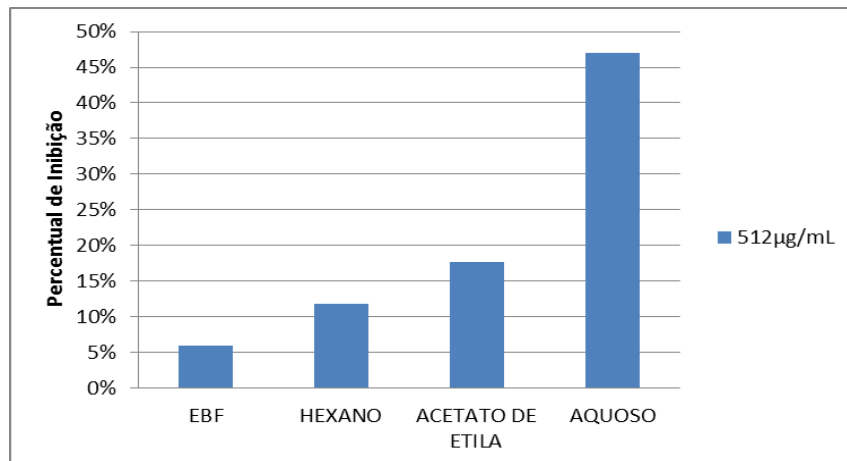


Figura 7 - Percentual de inibição do EBF e frações de *H.balsamifera* frente às amostras bacterianas clínicas isolada de sítios de infecção hospitalar.

Quadro 5 – Perfil e total de inibição das amostras clínicas coletadas de diferentes sítios de infecção hospitalar de pacientes internados no Hospital Universitário da UFRJ

AMOSTRAS CLÍNICAS INIBIDAS a 512 µg/mL		
EXTRATO	BACTÉRIAS INIBIDAS	Nº DE BACTÉRIAS
EBF	MU-50	1
HXA	OXA-51, MU-50	2
AcOEt	1006, 1015, 517	3
AQ	MU-50, 1006, 529, 517, 527, 520, 646, 1015	8

A ilustração dos resultados obtidos no ensaio de avaliação da atividade antibacteriana pelo método de diluição em ágar MH para a fração hexânica está representada na **figura 8** à seguir.

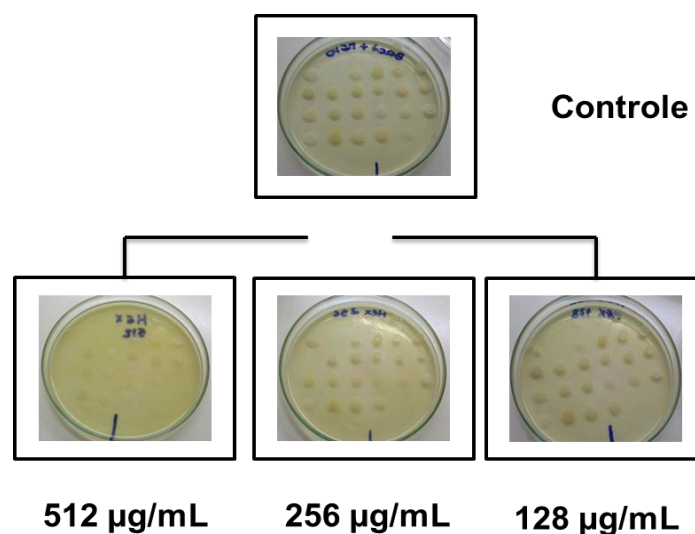


Figura 8 - Resultados obtidos pelo método de diluição em ágar para a fração HXA - representação esquemática da leitura em placa após crescimento por 24h à 37°C.

As infecções hospitalares são a segunda principal causa de morte no mundo, seguida de doenças cardiovasculares, além de ser um grande problema socioeconômico, devido ao aumento do tempo de internação em UTIs, o que leva ao aumento dos custos com o tratamento (OLAECHEA *et al.*, 2010). Portanto, a busca por novas alternativas de tratamento que atuem no combate aos patógenos causadores deste quadro é de grande importância científica.

Neste contexto, é importante destacar a capacidade inibitória do extrato bruto da folha (EBF) e de frações frente a espécies do gênero *Staphylococcus*. Entre as espécies inibidas pelos extratos estão a cepa ATCC 33591 (RO) e amostras clínicas de *S. aureus* (RO), além de *S. aureus* resistentes à vancomicina (MU-50). A fração HXA inibiu ambas (ATCC 33591 e MU-50) sendo, entretanto, o valor de CMI (512 µg/mL) mais elevado quando comparado a CMI de 128 µg/mL do antibiótico padrão oxacilina (LEAL *et al.*, 2010) frente a este patógeno. Este resultado é, contudo, de grande relevância, considerando que trata-se da atividade de um extrato bruto e não de uma substância isolada. O *S. aureus* é um patógeno oportunista e extremamente mutável caracterizando a principal causa de infecções hospitalares (FENG *et al.*, 2008) e que pode desenvolver resistência rapidamente (RODRÍGUEZ-NORIEGA *et al.*, 2010), o que torna ainda mais relevante estes resultados preliminares.

O EBF e frações (HXA, AQ e AcOEt) das folhas da espécie *H. balsamifera* também inibiram a espécie *S. epidermidis*, que juntamente com a espécie mais patogênica *S. aureus*, contribui para a maioria de infecções nosocomiais (SCHOENFELDER *et al.*, 2010). Apesar da cepa ATCC avaliada ser uma amostra sensível à oxacilina, com CMI de 0,25 µg/mL para oxacilina (LEAL *et al.*, 2010), os dados são importantes considerando o perfil de resistência que estes patógenos passam a apresentar ao longo do tempo.

Vale ressaltar também, a ação inibitória do extrato bruto da folha e das frações HXA, AcOEt e AQ frente à amostra clínica e/ou ATCC de *A. baumannii* resistentes ao imipenem (ATCC 48696 e OXA-51). A fração AQ inibiu a amostra ATCC à 128 µg/mL, sendo, portanto, necessários novos ensaios para a real determinação da CMI. Estes resultados podem ser considerados extremamente relevantes, já que a espécie *A. baumannii* mostrou uma expansão em todo o mundo e tem sido cada vez mais presente nas UTIs (GIAMARELLOU *et al.*, 2008). A natureza da resistência deste patógeno e seus padrões de susceptibilidade inusitados e imprevisíveis tem tornado as decisões terapêuticas cada vez mais difíceis

(FISHBAIN e PELEG, 2010) e também tem, supostamente, contribuído para o aumento da morbidade, mortalidade, tempo de internação e custo nas UTIs (SHORR, 2009).

Os resultados obtidos demonstram pela primeira vez para a espécie *H. balsamifera* uma atividade anti-estafilocócica muito significativa, já que grande parte das amostras inibidas pelos extratos pertencem ao gênero *Staphylococcus*. Além disso, os extratos também desempenham atividade significativa frente a bactérias Gram-negativas, que por sua estrutura de parede celular e mecanismos de resistência ainda representam uma barreira ao tratamento com os antibióticos utilizados atualmente.

5.4. ISOLAMENTO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DA FRAÇÃO HEXÂNICA

A atividade antibacteriana observada para a fração hexânica é um dos fatores que justifica a escolha desta fração para o isolamento e identificação dos constituintes majoritários presentes. Além deste fato, a fração hexânica apresentou o segundo melhor rendimento comparado aos demais extratos ativos. A fração com o maior rendimento (INS) mostrou-se insolúvel em uma variedade de solventes-teste, o que tornou difícil desenvolver posteriores etapas de purificação. Considerando o conhecimento prévio de que esta espécie vegetal é rica em triterpenos e que esta classe química é bastante conhecida por apresentar atividade antibacteriana, focamos nossos estudos neste extrato mais apolar.

5.4.1 Análises Cromatográficas da Fração Hexânica

A análise por cromatografia em camada fina (CCD) da fração hexânica levou ao aparecimento de manchas com uma coloração roxa estável quando utilizado anisaldeído sulfúrico como reagente cromogênico, sugerindo a presença de esqueletos terpênicos ou esteroidais como majoritários.

A identificação destes esqueletos foi confirmada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) (**Figura 9**), uma vez que indicou a presença de derivados triterpênicos pentacíclicos a partir do espectro de massas característico para esta classe.

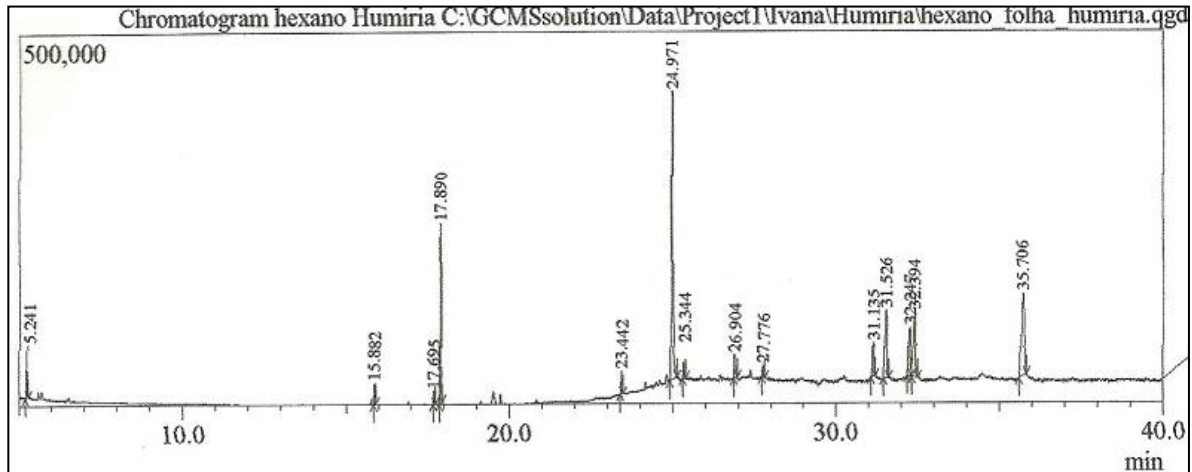


Figura 9 - Cromatograma da fração hexânica obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).

5.4.2 Análises Cromatográficas das Sub-frações da Fração Hexânica

As sub-frações obtidas do processo de fracionamento por cromatografia em coluna da fração hexânica (item 4.3.1.2) foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com a semelhança nos fatores de retenção dos constituintes majoritários presentes (**Figura 10**). A partir desta análise, constatou-se o isolamento de algumas substâncias sugestivas de apresentarem esqueletos terpênicos devido ao aparecimento da coloração arroxeadada após revelação. Dentre as sub-frações obtidas, aquelas que apresentaram maior grau de pureza foram selecionadas e submetidas a análise por CG/EM, como por exemplo, a fração N.º 90 .

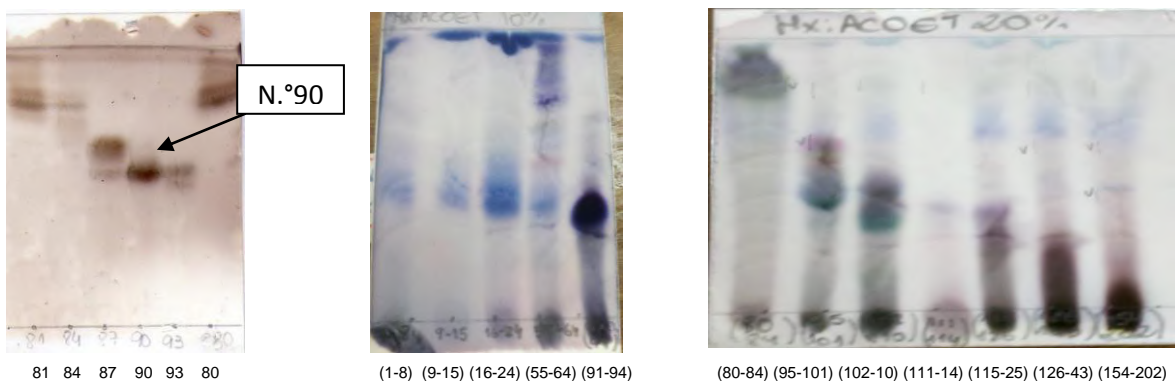


Figura 10 - CCD de sub-frações obtidas do processo de fracionamento em coluna de sílica da fração HXA.

A partir do cromatograma da sub-fração N.º 90 obtido pela técnica de CG/EM (**Figura 11**) foram observados dois picos principais com tempos de retenção de 33,13 (25,37% área relativa) e 34,17 (40,52%) minutos. Ambos fragmentogramas

(Figura 12) apresentaram o íon molecular 426 [M⁺] correspondente ao peso molecular e, o pico base m/z 218, característico das séries Δ^{12} -ursano ou oleanano (ligação dupla entre os carbonos C(12)-C(13), proveniente de um arranjo do tipo retro-Diels-Alder (SHIOJIMA *et al.*, 1992). Outros fragmentos, m/z 207, m/z 203 e m/z 189, foram também observados, conforme mostra a figura 12.

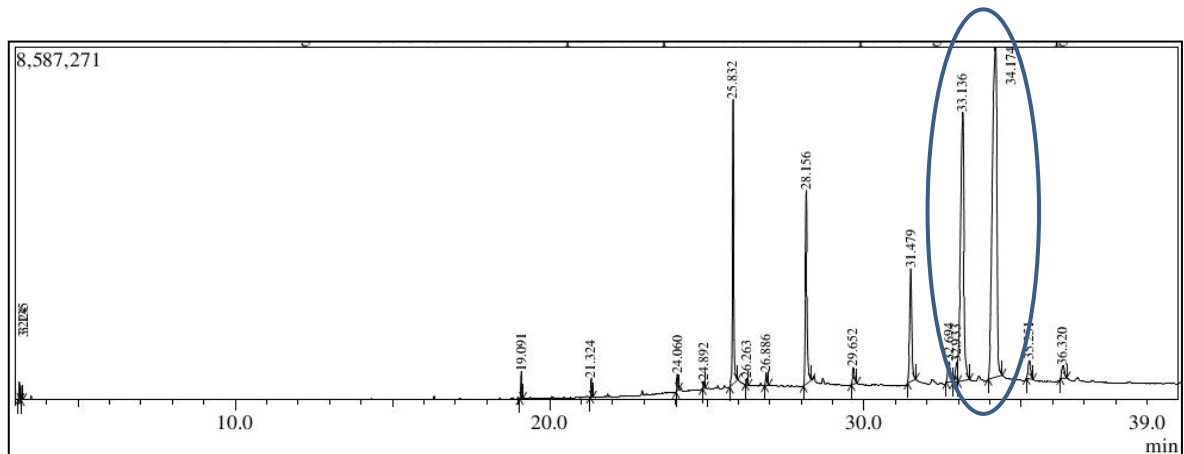


Figura 11 - Cromatograma da sub-fração N.º 90 obtida do processo de fracionamento em coluna de sílica da fração HXA

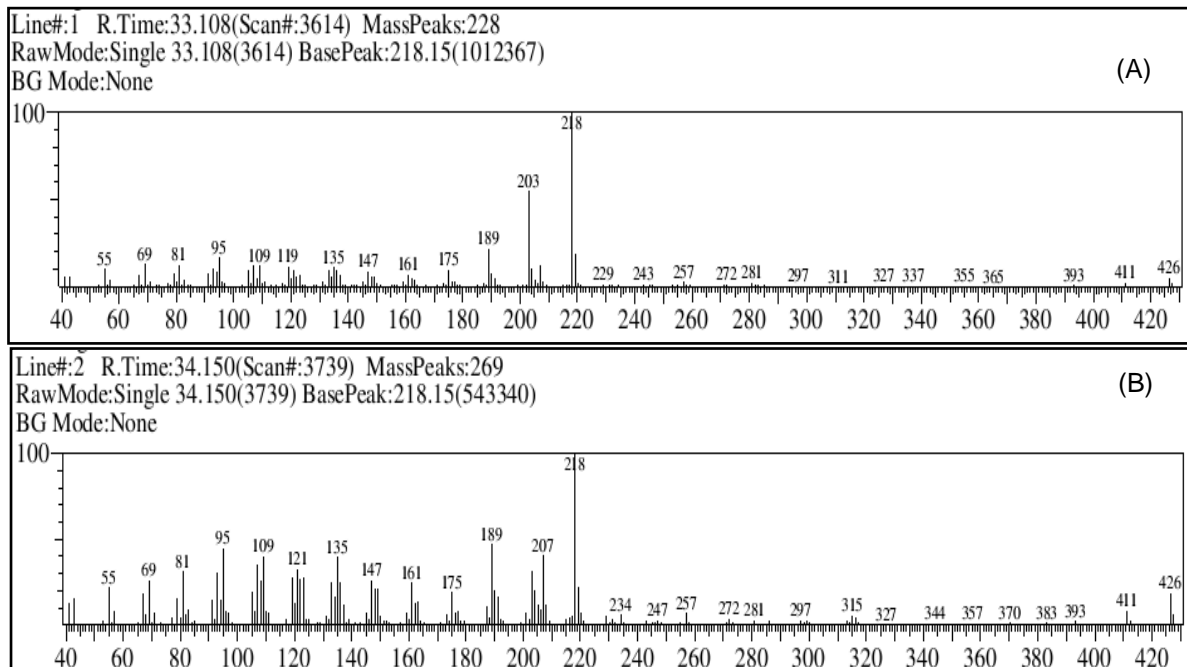


Figura 12 - Espectros de massas obtidos a partir da técnica de CG/EM referentes às substâncias presentes na sub-fração N.º 90 com tempos de retenção de 33,14 (A) e 34,17 (B) minutos.

Considerando as fragmentações observadas para estas substâncias, sugeriu-se a presença da mistura de α - e β -amirina, caracterizadas pela presença dos fragmentos principais conforme descritos na **Figura 13** (SHIOJIMA *et al.*, 1992).

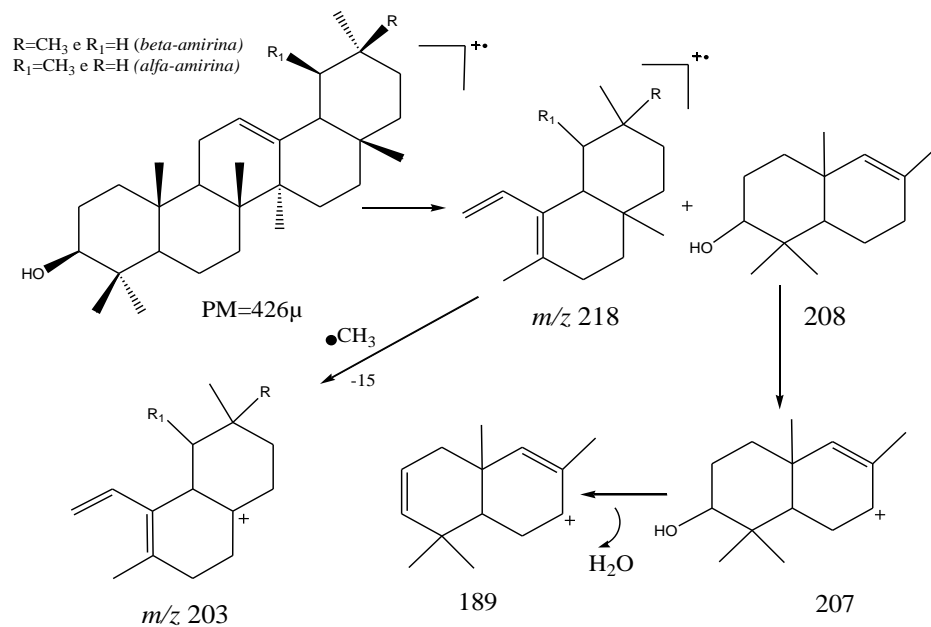


Figura 13 - Principais fragmentos obtidos por espectrometria de massas para os triterpenos α - e β -amirina.

Aos triterpenos α - e β -amirina já foram descritas atividades inibitórias relevantes frente a diferentes espécies bacterianas. Misturas de α - e β -amirinas mostraram ser responsáveis por inibir, dentre outros, *S. aureus* (CMI = 250 μ g/mL), *E. Coli* (CMI = 250 μ g/mL), *P. aeruginosa* (CMI = 120 μ g/mL) (MAGINA *et al.*, 2012; KIPLIMO *et al.*, 2011), *B. subtilis* (CMI = 250 μ g/mL) e *S. epidermidis* (CMI = 500 μ g/mL) (KIPLIMO *et al.*, 2011). Entre as bactérias inibidas pela β -amirina estão *Salmonella typhimurium* (CMI = 95 μ g/mL), *S. aureus* (CMI \geq 97 μ g/mL) e *P. aeruginosa* (CMI \geq 97 μ g/mL) (HICHRI *et al.*, 2003). Estas substâncias apresentaram valores de CMI bastante próximos àqueles exibidos pela fração HXA (512 μ g/mL) no presente estudo, podendo, portanto, esta mistura estar atuando como importante candidata responsável pela atividade antibacteriana observada para a fração HXA.

Outras sub-frações, onde foi observado elevado grau de pureza, como as de N.º(65-71) e (72-79) foram também avaliadas pela técnica de CG/EM. Nos cromatogramas referentes a estas sub-frações (**Figura 14**) foram observados picos principais com tempos de retenção semelhantes para ambas, a saber: 37,34

(85,41% área relativa) e 37,31 (90,26% área relativa) minutos, respectivamente. Ambos espectros de massas (**Figuras 15**) apresentaram o íon molecular 426 [M^+] correspondente ao peso molecular e, o pico base m/z 69 (TUAN *et al.*, 2005). Outros fragmentos foram também observados como m/z 341, m/z 273, m/z 246, m/z 218 e m/z 191.

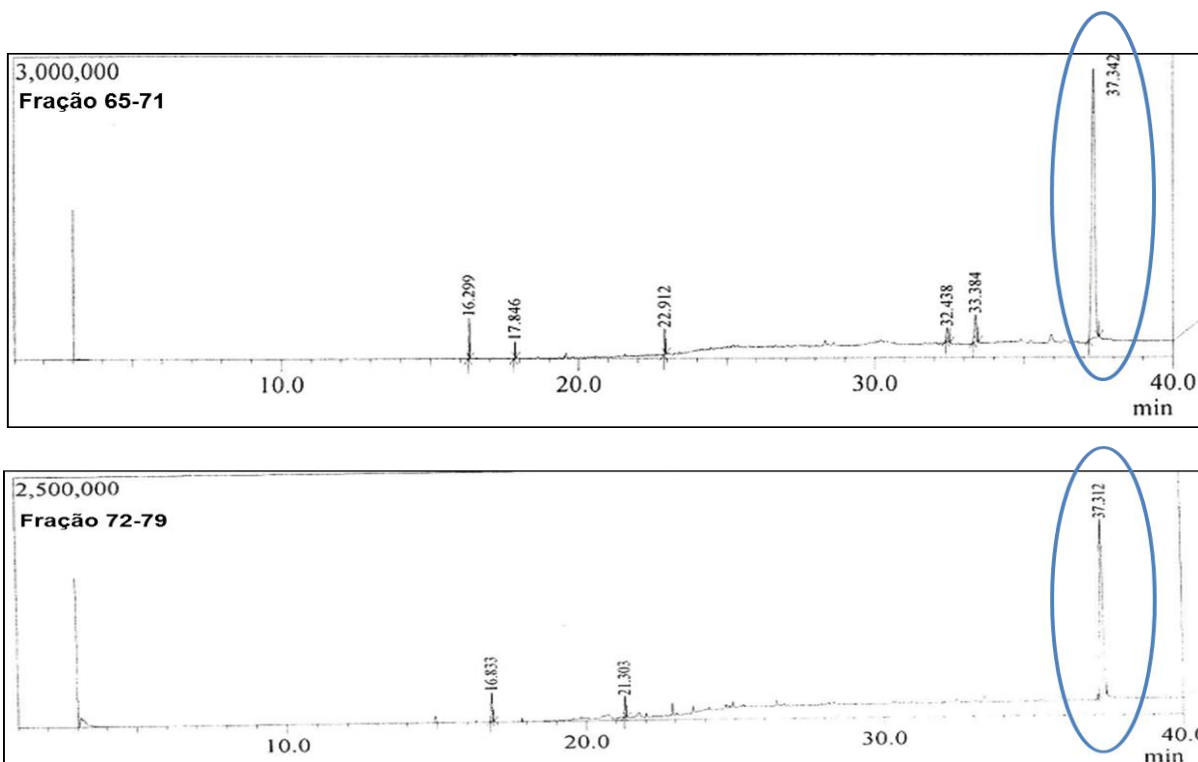


Figura 14 - Cromatogramas das sub-frações (65-71) e (72-79) obtidas do processo de fracionamento em coluna de sílica da fração HXA

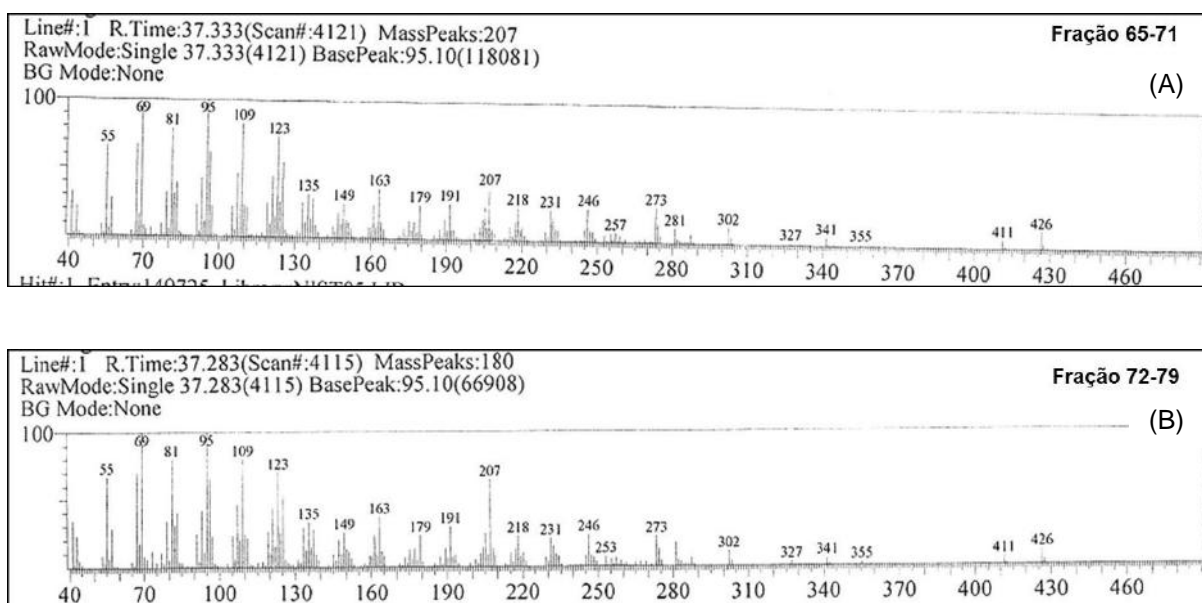


Figura 15 - Espectros de massas obtidos a partir da técnica de CG/EM referentes às substâncias presentes nas sub-frações (65-71) e (72-79) com tempos de retenção de 37,34 (A) e 37,31 (B) min, respectivamente.

Ao comparar as fragmentações obtidas para as substâncias presentes nas sub-frações (65-71) e (72-79) com as fragmentações descritas na literatura (**Figura 16**) (SHIOJIMA *et al.*, 1992; QUEIROGA *et al.*, 2000; TUAN *et al.*, 2005), pode-se sugerir que estas substâncias sejam derivadas do esqueleto triterpênico pentacíclico do tipo friedelina.

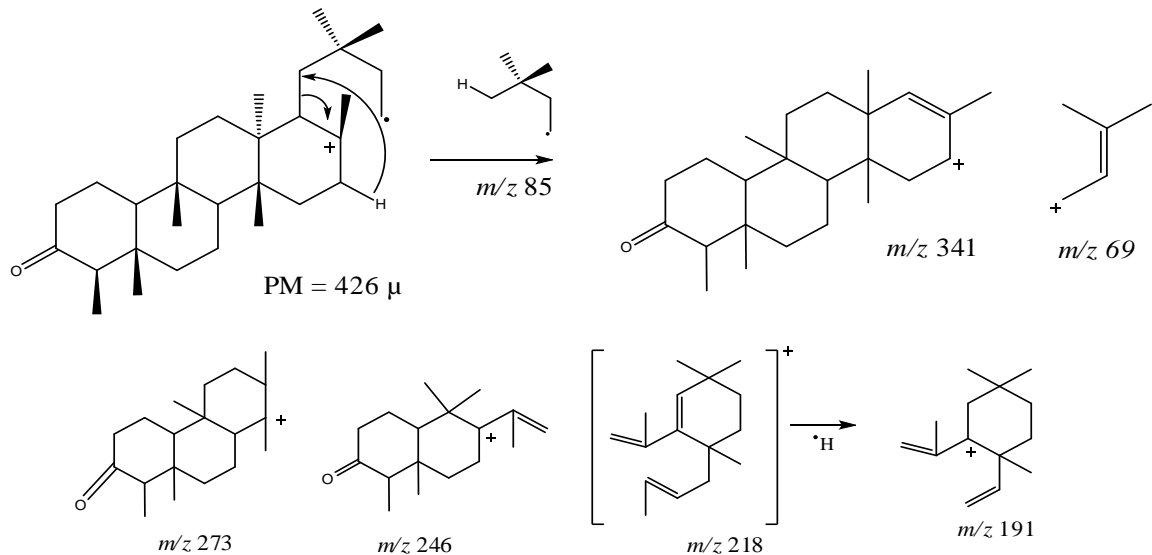


Figura 16 – Fragmentos típicos do esqueleto triterpênico friedelina obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

O triterpeno friedelina já vem sendo descrito na literatura quanto à sua atividade inibitória bastante significativa frente a algumas espécies de bactérias, entre estas, espécies de *S. aureus* (CMI = 19,53 μg/mL), *Escherichia coli* (CMI = 78,12 μg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (CMI = 2,44 μg/mL) e *Streptococcus faecalis* (CMI = 2,44 μg/mL) (KUETE, *et al.* 2007). Estes valores de CMI são menores quando comparados aqueles encontrados no presente trabalho (512 μg/mL), o que sugere o triterpeno tipo friedelina não ser unicamente o responsável pelo efeito da fração HXA. Estes esqueletos, possivelmente, estão contribuindo para a importante atividade antibacteriana, entretanto, a atividade observada para a fração hexânica deve ser resultado de um efeito proporcionado pelos diferentes triterpenos. Para a confirmação dos dados quanto ao papel desempenhado por cada uma destas substâncias na ação antibacteriana, seria de fundamental importância a avaliação da atividade destes constituintes isoladamente.

5.4.3 Elucidação Estrutural da Sub-fração N.º 05

Considerando a pureza da fração N.º05 (7 mg) pela técnica de CCD, esta também foi submetida a análise por RMN-¹H (400 MHz), tendo sido sugerida a presença de um terpeno como constituinte químico majoritário. Os dados de RMN seguem conforme à seguir:

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) – δ (ppm) (*t*, δ_H 0,88); (*s*, δ_H 1,36); (*s*, δ_H 1,40); (*s*, δ_H 1,49); (*s*, δ_H 1,55); (*m*, δ_H 3,69); (*dd*, δ_H 3,78); (*dd*, δ_H 3,93); (2H, *ddd*, δ_H 4,25); (*d*, δ_H 4,35); (*dd*, δ_H 4,62).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) – δ (ppm) 14,12 (CH₃); 22,69 (CH₂); 23,95 (CH₃), 25,31(CH₃); 25,78 (CH₃); 25,45 (CH₃); 29,36 (C₄); 31,92 (CH₂); 61,28 (CH₂); 65,60 (CH₂); 70,02 (CH); 70,80 (CH); 71,05 (CH); 103,05 (C₄); 108,51 (C₄); 109,07 (C₄).

A presença de quatro sinais simples característicos de grupos metila na região entre 1,3-1,6 ppm no espectro de RMN-¹H (**Figura 17**) puderam ser evidenciados. Estes quatro sinais podem indicar a presença de metilas sesquiterpênicas, classe química já descrita para *H. balsamifera*. Sinais em deslocamentos químicos maiores (região entre 3,5-4,8 ppm) indicam a presença de grupos funcionalizados na estrutura, entretanto, excluem a presença de duplas ligações conforme observado para a trans-isolongifolenona. No referido sesquiterpeno, já isolado de *H. balsamifera*, são também observados quatro sinais simples metílicos, entretanto, os deslocamentos químicos dos hidrogênios da dupla caem em torno de 5,6 ppm. O espectro de RMN-¹³C indicou a presença de 15 átomos de carbono, corroborando a proposta da presença do esqueleto sesquiterpênico. A técnica APT permite a identificação das multiplicidades dos sinais, o que permitiu e confirmou a presença de metilas na região indicada (δ entre 20 e 30 ppm). A presença de metilenos e carbonos quaternários, típicos de anéis terpênicos, foram confirmados por esta técnica.

Os espectros bidimensionais HSQC (correlação direta entre os átomos de carbono e hidrogênio com até uma ligação) e HMBC (correlação até duas ligações) foram também realizados e encontram-se em anexo.

A análise para determinação do espectro de massas da substância pela técnica de ionização por electrospray (ESI), a qual fornece o íon molecular, será realizada em uma próxima etapa a fim de auxiliar na análise e na elucidação estrutural deste constituinte.

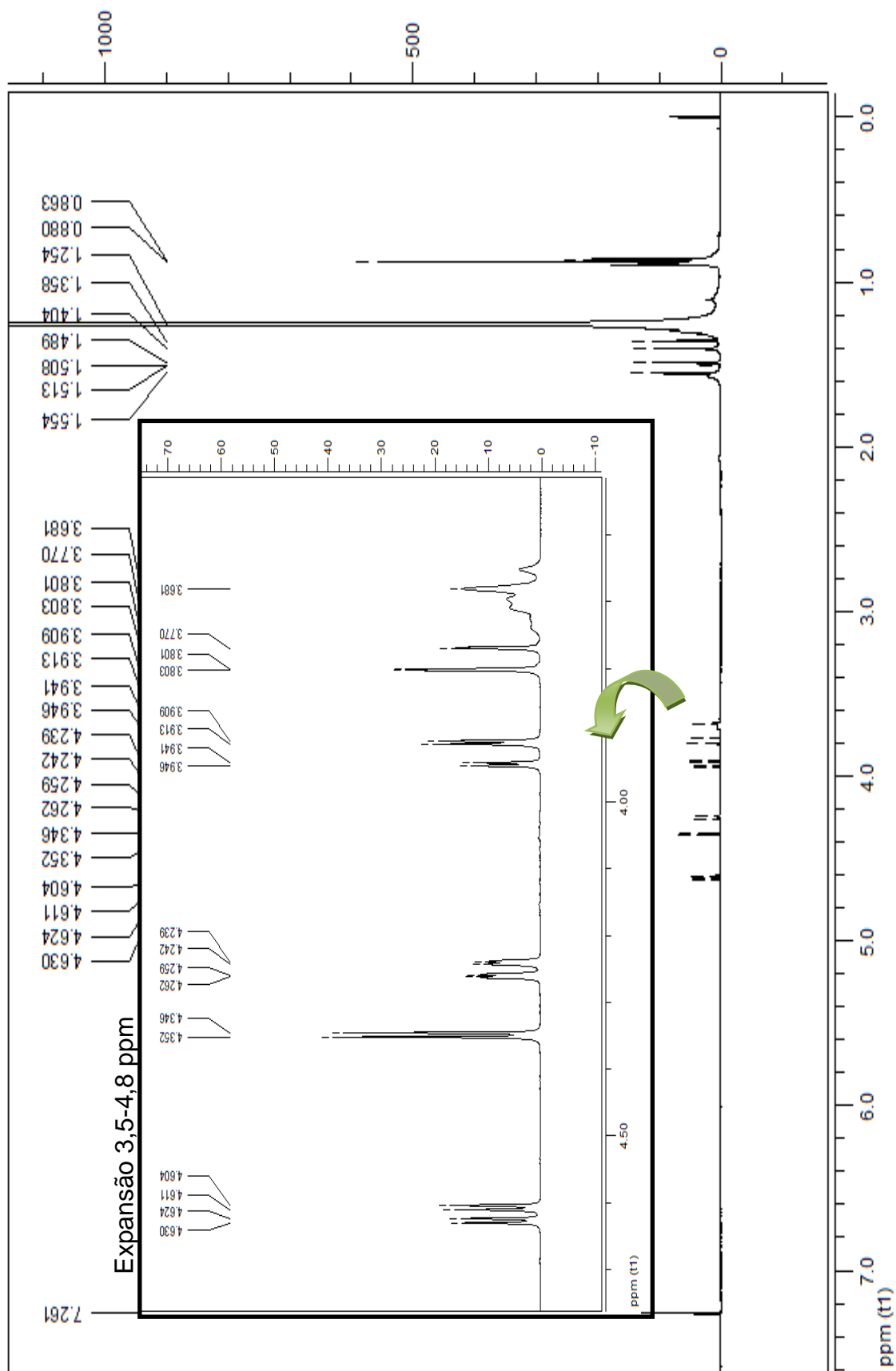


Figura 17 - RMN-¹H da sub-fração N.º 05 em CDCl₃ (400 MHz)

6. CONCLUSÃO

- No ensaio antibacteriano pelo método de diluição em ágar Müller-Hinton, o EBF, à 512 µg/ mL, inibiu 7 do total de amostras testadas, enquanto o EBC inibiu apenas 1 das 32 amostras. Isto justifica o EBF ter sido selecionado para posterior etapa de particionamento líquido-líquido com os demais solventes.
- O extrato aquoso apresentou o melhor perfil de atividade uma vez que inibiu pelo menos 1 amostra (*A. baumannii* resistente ao imipenem) dentre as 32 bactérias testadas na menor concentração (128 µg/mL) avaliada.
- À 256 µg/mL apenas o EBF e, as frações AQ e AcOEt, apresentaram atividade inibitória frente a um total de 2, 1, 2 bactérias, respectivamente. Entre as espécies inibidas encontram-se *A. baumannii* resistente ao imipenem (sensível ao EBF, AQ e AcOEt), e, as espécies *S. capititis*, *S. warneri* e *S. cohnii* (sensível ao EBF e AcOEt).
- À 512 µg/mL o extrato aquoso mostrou a melhor atividade, inibindo 14 do total de amostras testadas (n=32), dentre elas amostras clínicas de *S. aureus* resistentes e sensíveis a oxacilina e, a cepa de referência de *A. baumannii* resistente ao imipenem.
- Na concentração de 512 µg/mL, as frações em acetato de etila e hexânica também apresentaram importante atividade, inibindo um total de 9 e 6 bactérias, respectivamente, incluindo amostras clínicas de *S. aureus* resistentes e sensíveis a oxacilina, amostras de referência de *S. aureus* resistente a oxacilina e *S. epidermidis*.
- À 512 µg/mL, as frações em diclorometano, butanólico e o decocto mostraram atividade frente a um total de 4, 1 e 1 bactéria(s), respectivamente, exibindo, portanto, atividades menos significativas .

- A atividade antibacteriana observada para fração HXA, o seu melhor rendimento comparado aos demais extratos ativos passíveis de solubilização e o conhecimento prévio de que esta espécie vegetal é rica em triterpenos e que esta classe química é bastante conhecida por apresentar atividade antibacteriana, justificaram a análise dos constituintes químicos desta fração.
- A identificação dos esqueletos presentes na fração HXA foi confirmada por CG/EM, uma vez que indicou a presença de derivados triterpênicos pentacíclicos a partir do espectro de massas característico para esta classe.
- A sub-fração n° 90 submetida a análise pela técnica de CG/EM revelou a presença da mistura dos triterpenos pentacíclicos α/β - amirina, substâncias com valores de CMI descritos na literatura bastante próximos àqueles exibidos pela fração HXA (512 $\mu\text{g}/\text{mL}$), podendo, portanto, atuarem como importantes candidatas responsáveis pela atividade antibacteriana desempenhada pelo extrato hexânico neste estudo.
- As sub-fracções (65-71), (72-79) ao serem avaliadas por CG/EM sugeriram a presença de substâncias derivadas do esqueleto triterpênico do tipo friedelina, substância que apresenta valores de CMI descritos na literatura menores quando comparados aqueles encontrados no presente trabalho (512 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o que sugere o triterpeno friedelina não ser o único responsável pelo efeito da fração HXA.
- Pelos resultados obtidos, pode-se destacar a grande importância deste estudo, já que apresenta resultados ainda não descritos na literatura como a avaliação da atividade antibacteriana de extratos de diferentes polaridades da espécie *H. balsamifera* frente à diferentes espécies de bactérias, entre estas amostras multirresistentes.
- Este trabalho sugere, pela primeira vez, a correlação entre a atividade antibacteriana observada para a fração hexânica e a presença dos triterpenos pentacíclicos nesta fração.

7. BIBLIOGRAFIA

1. AMORIM, A.M.A., MEDEIROS, H. 2012. *Humiriaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em : <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000129>. Acesso em : 17 Jan. 2013.
2. ANDRADE, S. S.; RONALD N.; GALES, A. C.; SADER, H. S. **Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2001)**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 52, p.140–141, maio 2003.
3. BIBI, Y.; NISA, S.; CHAUDHARY, FM.; ZIA, M. **Antibacterial activity of some selected medicinal plants of Pakistan**. *BMC Complement Altern Med*, v.11, n.1, p.1-7, jun. 2011.
4. CHOUDHARY, M. I.; MUSHARRAF, S. G.; KHAN, M.T.H.; ABDELRAHMAN, D.; PARVEZ, M.; SHAHEEN, F.; ATTA-UR-RAHMAN. **Microbial transformation of isolongifolen-4-one**. *Helv. Chim. Acta*, vol. 86, n.10, p. 3450-3460, out. 2003.
5. COELHO-FERREIRA, M. **Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil)**. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 126, n.1 p.159–175, out. 2009.
6. COWAN, M.M. **Plant Products as Antimicrobial Agents**. *Clinical Microbiology Reviews*, vol.12, n.4, p. 564-582, out. 1999.
7. DA SILVA, S.L.; DE OLIVEIRA, V.G.; YANO, T.; NUNOMURA, R. de C.S. **Antimicrobial activity of bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.** *Acta Amazonica*, vol. 39, n. 1, p. 187-192, mar. 2009.
8. DA SILVA, T.B.C.; ALVES, V.L.; MENDONÇA, L.V.H.; CONSERVA, L.M.; ROCHA, E.M.M.; ANDRADE, E.H.A.; LEMOS, R.P.L.. **Chemical Constituents and Preliminary Antimalarial Activity of *Humiria balsamifera***. *Pharmaceutical Biology*, vol. 42, No. 2, p. 94–97, abr. 2004.
9. DE ABREU, H.A.; LAGO, I.A.dos S.; SOUZA, G.P; PILÓ-VELOSO, D.; DUARTE, H.A.; ALCÂNTRA, A.F.de C. **Antioxidant activity of (+)-bergenin—a phytoconstituent isolated from the bark of *Sacoglottis uchi* Huber (Humireaceae)**. *Org. Biomol. Chem.*, vol. 6, p. 2713–2718, jun. 2008.

10. DE LIMA, M.R.F.; LUNA, S.J.; DOS SANTOS, A.F.; DE ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, JP.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MUREAU, N. **Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants.** *Journal of Ethnopharmacology*, vol.105, n. 1-2, p. 137–147, abr. 2006.
11. DEVAPPA, R.K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. **Jatropha Diterpenes: a Review.** *J Am Oil Chem Soc.*, vol. 88, n.1, p. 301–322, mar. 2011.
12. DOS SANTOS, R.I. **Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários.** In: SIMÕES, C.M.O (Org.). *et al.* *Da Planta ao Medicamento.* 6. ed.1.reimp. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2010. p. 404, 429, 469.
13. DUBEY, D. e PADHY, R. **Surveillance of multidrug resistance of two Gram-positive pathogenic bacteria in a teaching hospital and in vitro efficacy of 30 ethnomedicinal plants used by an aborigine of India.** *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, vol.2, n. 4, p.273-281, ago. 2012.
14. DUNSTAN, C. A.; NOREEN, Y.; SERRANO, G.; COX, P. A.; PERERA, P.; BOHLIN, L. **Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assays.** *Journal of Ethnopharmacology*, vol 57, n.1, p.35-56, jun.1997.
15. FENG, Y.; CHEN, C. J.; SU, L.H.; HU, S.; YU, J.; CHIU, C.H. **Evolution and pathogenesis of Staphylococcus aureus: lessons learned from genotyping and comparative genomics.** *FEMS Microbiology Rev.*, vol. 32, n.1, p.23–37, nov. 2008.
16. FISHBAIN, J.; PELEG, A.Y. **Treatment of Acinetobacter Infections.** *Clin Infect Dis.*, vol. 51, n.1, p. 79-84, jul. 2010.
17. GALES, A. C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N.; SADER, H. S. **Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010).** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 73, n. 4, p. 354–360, ago. 2012.
18. GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A.; KANELLAKOPOULOU, K. **Acinetobacter baumannii: a universal threat to public health?** *Int J Antimicrob Agents*, vol 32, n. 2, p.106-119, ago. 2008.

19. HARBARTH, S. e SAMORE, M.H. **Antimicrobial Resistance Determinants and Future Control**. *Emerg. Infect. Dis.*, Vol. 11, n. 6, p. 794-801, jun.2005.
20. HICHRI, F.; JANNET, H. B.; CHERIAA, J.; JEGHAM, S.; MIGHRI, Z. **Antibacterial activities of a few prepared derivatives of oleanolic acid and of other natural triterpenic compounds**. *C. R. Chimie*, vol. 6, n.4, p. 473–483, abr. 2003.
21. HOERLLE, J.; BRANDELLI, A. **Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the intensive care unit of a general hospital in southern Brazil**. *J Infect Dev Ctries*, vol. 3, n.7, p.504-510, ago. 2009.
22. KELECOM, A.; REIS, G. L.; FEVEREIRO, P. C.A.; SILVA, J. G.; SANTOS, M. G.; MELO NETO, C. B.; GONZALES, M. S.; GOUVEA, R. C.S.; ALMEIDA, G. S.S. **A multidisciplinary approach to the study of the fluminense vegetation***. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 74, n°.1, p.171–181, mar. 2002.
23. KIPLIMO, J. J.; KOORBANALLY, N. A.; CHENIA, H. **Triterpenoids from *Vernonia auriculifera* Hiern exhibit antimicrobial activity**. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 5, n. 8, p. 1150-1156, ago. 2011.
24. KUETE, V.; NGUEMEVING, J.R.; BENG, V.P.; AZEBAZE, A.G.; ETOA, F.X.; MEYER, M.; BODO, B.; NKENGFAK, A.E. **Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (*Guttiferae*)**. *J Ethnopharmacology*, vol.109, n.3, p.372-379, fev. 2007.
25. KRASUTISKY, P.A.; CARLSON, R.M.; KARIM, R. **Triterpenes having antibacterial activity**. United States Patent Application Publication. Pub.N° US2004/0097436A1, 20 maio 2004.
26. LEAL, I.C.R. **Investigação química e avaliação da atividade antibacteriana de espécies vegetais e determinação estrutural de produtos de biotransformação microbiana**. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
27. LEAL, I.C.R.; DOS SANTOS, K.R.N.; ITABAIANA JUNIOR, I.; ANTUNES, O.A.C.; PORZEL, A.; WESSJOHANN, L.; KUSTER, R.M. **Ceanothane and Lupane Type Triterpenes from *Zizyphus joazeiro* – An Anti-*Staphylococcal* Evaluation**. *Planta Medica*, vol.76, n. 1, p. 47-52, jan. 2010.

28. LEWIS, M.T.; GALES, A.C.; SADER, H.S.; PFALLER, M.A.; JONES, R.N. **Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from Latin America patients with a diagnosis of pneumonia: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program** (1998). *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, vol.37, n.1, p.63-74, maio. 2000.
29. LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. São Paulo. Nova Odessa: Plantarum, 2008.p.296.
30. MADUKA, H.C.C e OKOYE, Z.S.C. **The effect of *Sacoglottis gabonensis* stem bark extract, a Nigerian alcoholic beverage additive, on the natural antioxidant defences during 2,4-dinitrophenyl hydrazine-induced membrane peroxidation in vivo**. *Vascular Pharmacology*, vol. 39, n.1-2, p. 21 – 31, jul. 2002.
31. MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, E.M.; DALMARCOS, J.B.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. **Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis***. *Quím. Nova*, v. 35, n. 6, p.1184-1188, maio 2012
32. MARCINAK, J.F. e FRANK, A.L.. **Treatment of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children**. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 16, n.3, p. 265–269, jun. 2003.
33. MARX, F.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.D.B.; MAIA, J.G.S.. **Studies of edible amazonian plants. Part 5: Chemical characterization of Amazonian *Endopleura uchi* fruits**. *European Food Res Technol.*, vol. 214, n.4, p. 331–334, abr. 2002.
34. MUTHYALA, R. S.; SHENG, S.; CARLSON, K. E.; KATZENELLENBOGEN, B. S.; KATZENELLENBOGEN, J. A.. **Bridged bicyclic cores containing a 1,1-diarylethylene motif are high-affinity subtype-selective ligands for the estrogen receptor**. *J. Med. Chem.*, vol. 46, n.9, p. 1589 – 1602, fev. 2003.
35. NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**, 18th ed, Approved Standard, M07-A8, Pacific Beach Biosciences, 2008.
36. NNIS - NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM REPORT. **Data summary from January 1992 through june 2004**. *Am.J.Infect.Control.*, vol. 32, p. 470-485, dez. 2004.

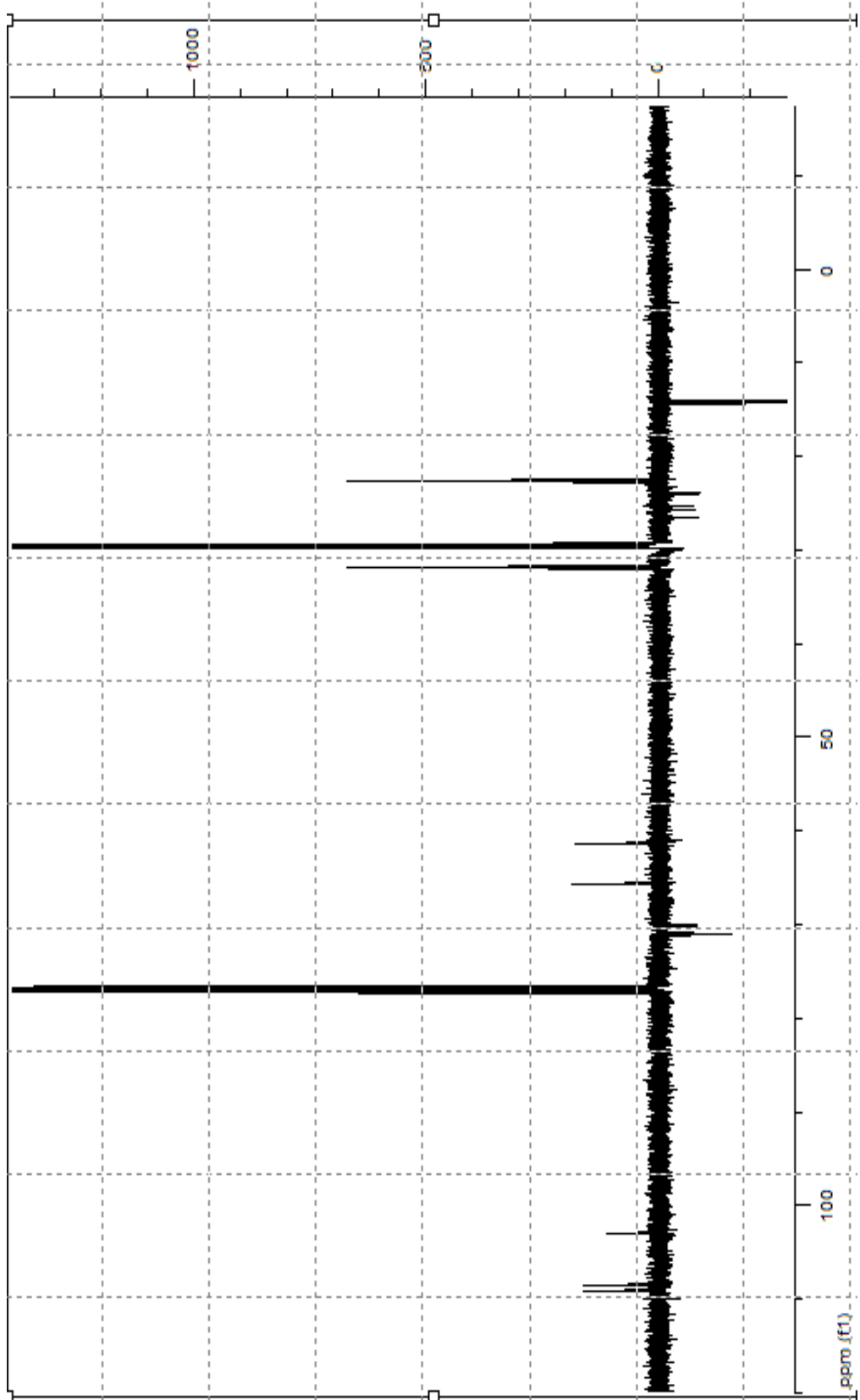
37. NUNOMURA, R. C. S.; OLIVEIRA, V. G.; DA SILVA, S.L.; NUNOMURA, S.M. **Characterization of Bergenin in *Endopleura uchi* Bark and its Anti-Inflammatory Activity.** *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 20, n. 6, p.1060-1064, 2009.
38. NWOSU, C.O; ENEME, T.A; ONYEYILI, P.A; OGUGBUAJA, V.O. **Toxicity and anthelmintic efficacy of crude aqueous of extract of the bark of *Sacoglottis gabonensis*.** *Fitoterapia*, vol. 79, n.2, p.101 – 105, ago. 2008.
39. OGAN, A.U. **An Isocoumarin from the bark of *Sacoglottis gabonensis*.** *Phytochemistry*, vol. 10, n.11, p. 2832-2833, nov. 1971.
40. OLAECHEA, P.M.; INSAUSTI, J.; BLANCO, A.; LUQUE, P. **Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales.** *Med. Intensiva*, v. 34, n. 4, p. 256-267, maio 2010.
41. OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. **Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*.** *Phytochemistry*, vol. 65, n.24, p. 3249–3254, dez. 2004.
42. PATEL, D.K.; PATEL, K.; KUMAR, R.; GADEWAR, M.; TAHILYANI, V.; **Pharmacological and analytical aspects of bergenin: a concise report.** *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, vol.2, n.2, p. 163-167, abr. 2012.
43. PDDSQ - PLANO DIRETOR DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DE QUISSAMÃ-RJ. RELATÓRIO FINAL PARTE I - ESTUDOS DE DIAGNÓSTICOS, p. 14-15, Mar. 2006.
44. POLITI, F.A.S; MELLO, J.C.P; MIGLIATO, K.F; NEPOMUCENO, A.L.A; MOREIRA, R.R.D; PIETRO, R.C.R.R. **Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activities and Determination of the Total Tannin Content of Bark Extracts *Endopleura uchi*.** *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, n.4, p. 2757-2768, abr. 2011.
45. QUEIROGA, C.M.; SILVA, G.F.; DIAS, P.C.; POSSENTI, A.; DE CARVALHO, J.E. **Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3b-ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia*(Celastraceae).** *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 72, n.3, p.465-468, out. 2000.
46. RODRÍGUEZ-NORIEGA, E.; SEAS, C.; GUZMÁN-BLANCO, M.; MEJÍA, C.; ALVARES, C.; BAVESTRELLO, L.; ZURITA, J.; LABARCA, J.; LUNA, C. M.; SALLES, M. J.C.; GOTUZZO, E. **Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America.** *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 14, n.4, p. e560–e566, jul. 2010.

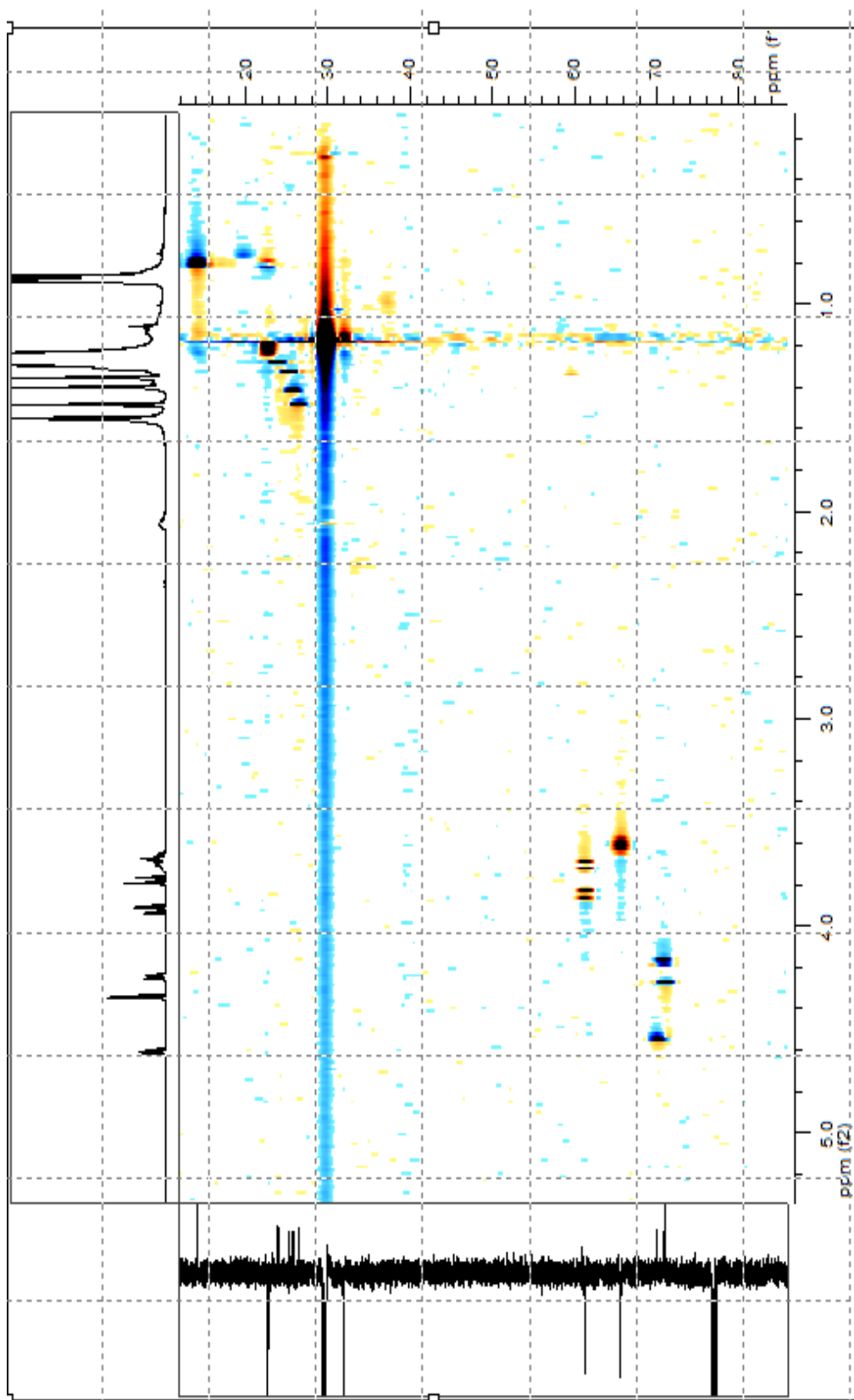
- 47.ROSSI, F. **The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil.** Antimicrobial Resistance, vol. 52, n.9, p. 1138-1143, maio. 2011.
- 48.RIOS, J.L. e RECIO, M.C. **Medicinal plants and Antimicrobial activity.** J. Ethnopharmacol., vol. 100, n. 1-2, p. 80-84, ago. 2005.
49. SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SILVA, J.B.; PIGNATARI, A.C.; SENTRY PARTICIPANTS GROUP (LATIN AMERICA). **SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001.** Brazilian Journal of Infectious Diseases, vol.8, n.1, p.25-79, fev. 2004
- 50.SCARANO, F.R. **Structure, function and florística relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic Rainforest.** Annals of Botany, vol 90, n.4, p. 517-524, set. 2002.
- 51.SCHOENFELDER, S.M. K.; LANGE, C.; ECKART, M.; HENNIG, S.; KOZYTSKA, S.; ZIEBUHR, W. **Success through diversity - how Staphylococcus epidermidis establishes as a nosocomial pathogen.** Int J Med Microbiol., vol. 300, n. 6, p.380-386, ago. 2010.
- 52.SHAI, L.J.; MCGRAW, L.J.; ANDEROGBA, M.A.; MDEE, L.K.; ELOFF, J.N. **Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata*(Burm.f) C.A. Sm. Leaves.** Journal of Ethnopharmacology, vol.119, n. 2, p. 238-244, set, 2008.
- 53.SHIOJIMA, K.; ARAI, Y.; MASUDA, K.; TAKASE, Y.; AGETA, T.; AGETA, H. **Mass-spectra of pentacyclic triterpenoids.** Chemical & Pharmaceutical bulletin, vol. 40, n. 7, p. 1683-1690. jul. 1992.
- 54.SHORR, A.F. **Review of studies of the impact on Gram-negative bacterial resistance on outcomes in the intensive care unit.** Crit Care Med., vol. 37, n.4, p.1463–1469, abr. 2009.
- 55.SOUZA, M.A.; SANCHES, I.S.; FERRO, M.L.; VAZ, M.J.; SARAIVA, Z.; TENDEIRO, T.; SERRA, J.; LENCASTRE, H. **Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone.** J. Clin. Microbiol., vol.36, n.9, p. 2590-2596, set.1998.

56. TENOVER, F. C. **Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria.** The American Journal of Medicine, vol.119,n.6A, p. S3–S10, jun. 2006.
57. TUAN, L.A.; HUNG, N.V.; CHIEN, N.Q. **Chemical Constituents of *Xerospermum laevigatum* Radlk.** Journal of Chemistry, vol.43,n.5, p. 643-646, 2005.
58. VOLPATO, A.M.M. **Avaliação do Potencial Antibacteriano de *Calendula officinales* para seu emprego como fitoterápico.** Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química-Departamento de Química Orgânica- Universidade de Curitiba, 2005.
59. WANG, H.; LI, MY; WU, J. **Chemical Constituents and Some Biological Activities of Plants from the Genus *Ceriops*.** Chem. Biodivers., vol. 9, n.1, p.1-11, jan.2012.
60. ZHANG, A.; KLUN, J. A.; WANG, S.; CARROLL, J. F.; DEBBOUN, M. **Isolongifolenone: A Novel Sesquiterpene Repellent of Ticks and Mosquitoes.** Journal of Medical Entomology., vol. 46,n. 1, p.100-106, jan. 2009.

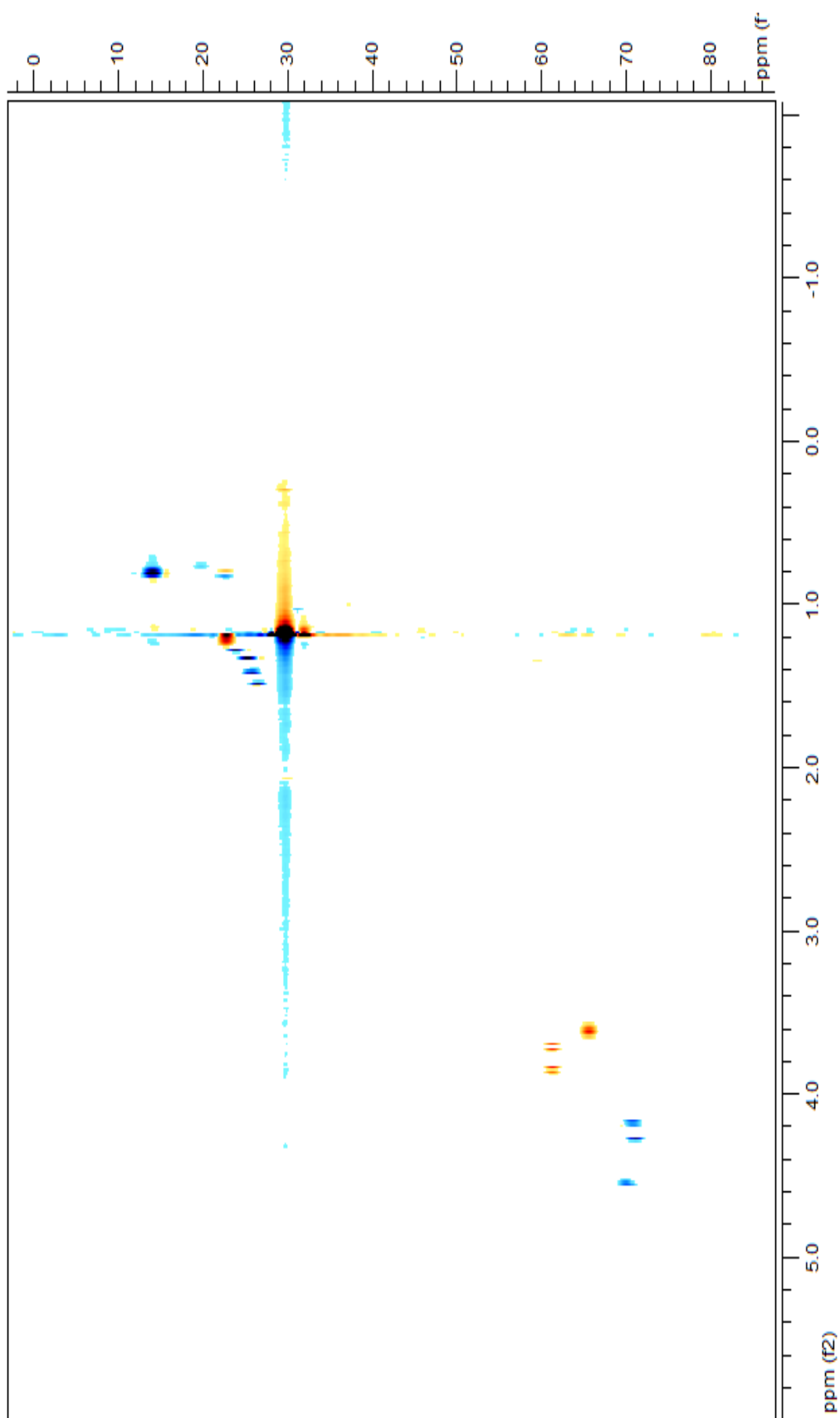
8. ANEXOS

ANEXO 1 - ESPECTRO APT DA SUB-FRAÇÃO N.º 05



ANEXO 2 - ESPECTRO APT CORRELACIONADO COM O RMN - ^1H DA SUB-FRAÇÃO N.º 05

ANEXO 3 - ESPECTRO HSQC DA SUB-FRAÇÃO N.º 05



ANEXO 4 - ESPECTRO HMBC DA SUB-FRAÇÃO N.º 05

