

MAÍSA FERNANDA DOS SANTOS BARBOSA

**BIOPROSPECÇÃO FARMACOLÓGICA DE *Erythroxylum revolutum* Mart.:
CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO EFEITO
ANTIMICROBIANO E MODIFICADOR DA RESISTÊNCIA MICROBIANA**

SERRA TALHADA,

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

BIOPROSPECÇÃO FARMACOLÓGICA DE *Erythroxylum revolutum* Mart.:
CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO EFEITO
ANTIMICROBIANO E MODIFICADOR DA RESISTÊNCIA MICROBIANA

Maísa Fernanda dos Santos Barbosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

Linha de pesquisa: Ecologia, Conservação e uso da Biodiversidade de Ambientes Terrestres/ Bioquímica e Farmacologia de Produtos Naturais.

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva
Orientador

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Coorientadores

SERRA TALHADA,

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca da UAST, Serra Talhada-PE, Brasil

B238b Barbosa, Maísa Fernanda dos Santos Barbosa
Bioprospecção Farmacológica de *Erythroxylum revolutum*
Mart.: Caracterização Fitoquímica e Avaliação do Efeito
Antimicrobiano e Modificador da Resistência Microbiana/ Maísa
Fernanda dos Santos Barbosa.
146 f. : il.

Orientador: Rogério de Aquino Saraiva.

Coorientadores: Henrique Douglas Melo Coutinho e Irwin
Rose Alencar de Menezes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e
Conservação, Serra Talhada, PE, 2018.

Inclui referências e apêndices.

1. Bioprospecção farmacológica. 2. Alcaloides tropânicos. 3.
Bioquímica-produtos naturais. I. Saraiva, Henrique Douglas Melo,
orient. II. Coutinho, Henrique Douglas Melo, coorient. III.
Menezes, Irwin Rose Alencar de. IV. Título.

CDD 631



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

**BIOPROSPECÇÃO FARMACOLÓGICA DE *Erythroxylum revolutum* Mart.:
CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO EFEITO
ANTIMICROBIANO E MODIFICADOR DA RESISTÊNCIA MICROBIANA**

Maísa Fernanda dos Santos Barbosa

Dissertação julgada adequada para obtenção do título de mestre em Biodiversidade e Conservação. Defendida e aprovada em 22/02/2018 pela seguinte Banca Examinadora.

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva - Orientador
[Unidade Acadêmica de Serra Talhada / UFRPE]

Prof^ª. Dr.^a. Virgínia Medeiros de Siqueira – Membro Externo
[Unidade Acadêmica de Serra Talhada / UFRPE]

Prof. Dr. Carlos André de Souza – Membro Externo
[Unidade Acadêmica de Serra Talhada / UFRPE]

“A compreensão do universo requer trabalho árduo. Ao mesmo tempo, nenhuma jornada humana é mais empolgante e potencialmente recompensadora do que a tentativa, às vezes bem-sucedida, de compreender parte do mundo natural.” (Nelson e Cox. In: Princípios de Bioquímica de Lehninger – Prefácio)

A Fernando e Salete, exemplo de pais e professores,
dedico.

Agradecimentos

Ao orientador deste trabalho, Rogério de Aquino Saraiva, pelo grande empenho e entusiasmo para desenvolver esta pesquisa, que no seu decorrer precisou superar inúmeras condições adversas.

À banca examinadora, pelo aceite do convite e, principalmente, pelas valiosíssimas contribuições.

Aos coorientadores Irwin Rose Alencar de Menezes e Henrique Douglas Melo Coutinho, pelas suas valiosíssimas contribuições ao estudo e, além disso, ao total auxílio à pesquisa, cedendo inclusive a infraestrutura dos seus respectivos laboratórios, o Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Molecular e o de Microbiologia e Toxicologia molecular, ambos da Universidade Regional do Cariri. Agradeço também à Janaina e Camila pelo auxílio nos testes antibacterianos e antifúngicos, respectivamente, inclusive, não posso deixar de mencionar a parceria e simpatia de ambas.

Ao professor Carlos André em especial, excelente Químico que teve um papel fundamental nos processos de obtenção e análise dos produtos naturais (extrato bruto e fração de alcaloides), acompanhando de perto todo o processo. Aproveito e estendo este agradecimento ao Laboratório de Química da Unidade Acadêmica de Serra Talhada/Universidade Federal Rural de Pernambuco e aos técnicos, Jaqueline, Felipe e Anderson, sempre solícitos e muito simpáticos.

Ao laboratório do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pelo espaço cedido para as análises de HPLC, principalmente aos professores Sérgio e Adriano e as mestrandas Thyala e Cidinha.

Ao laboratório de Química da Universidade... pela análise de CG-EM e pela ajuda mais uma vez do prof. Carlos André que tornou esta parceria possível.

Ao taxonomista André Laurênio, cujas contribuições foram muito além da identificação da espécie e auxílio na coleta, estando diretamente envolvido na escolha do objeto de estudo, devido aos seus conhecimentos sobre a biodiversidade da Caatinga e a quimiosistemática vegetal.

À Paulo Miranda, Patrícia, Danilo de Moraes e Lisandra, parceiros excepcionais do “Grupo de Estudos em Bioquímica, Farmacologia e Toxicologia Molecular”, do qual faço parte. O desenvolvimento das atividades de pesquisa dentro do grupo possibilitou a aquisição tanto de experiência laboratorial, quanto científica, no exercício da formulação e do teste de

hipóteses. Ele foi o principal agente formador desta pesquisadora que vos escreve (que ainda tem muito a aprender!) e de amigos que levarei para toda a vida.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco, pela concessão de bolsa de Mestrado.

Finalmente, a todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, meu muito obrigado!

Resumo

Diante da problemática das doenças infecciosas, principalmente as causadas por microorganismos resistentes a antibióticos, muitos esforços vem sendo feitos na tentativa de combater estas infecções. As pesquisas em bioprospecção vêm ganhando destaque neste cenário, pois muitos estudos envolvendo produtos naturais e drogas convencionais têm demonstrado resultados eficazes na modificação desta resistência. *Erythroxylum revolutum* é endêmica do Nordeste do Brasil e utilizada por povos tradicionais como afrodisíaca e para tratar problemas cardíacos. Ela é fonte de moléculas de interesse médico, sendo a fitoquímica do gênero a qual pertence é composta por alcaloides, principalmente os tropânicos, flavonoides e terpenoides, moléculas com uma vasta diversidade de atividades biológicas comprovadas. Assim, o objetivo deste trabalho é ressaltar o valor da conservação de espécies de *E. revolutum* como fonte de moléculas bioativas de interesse para a farmacologia. Os resultados desta pesquisa estão divididos em três artigos. O primeiro trata-se de uma revisão sistemática sobre os usos populares e o potencial farmacológico do gênero. O segundo é um artigo de pesquisa sobre os efeitos do extrato etanólico e da fração de alcaloides de *E. revolutum* sobre bactérias sensíveis e resistentes, sozinhos e combinados com antibióticos convencionais. O terceiro e último artigo testa os efeitos do extrato etanólico e da fração de alcaloides de *E. revolutum* contra espécies de *Candida*, sozinhos e combinados com o antifúngico fluconazol. A prospecção fitoquímica e um teste de toxicidade também foram realizados para ambos os produtos, extrato etanólico e fração de alcaloides. Nossos resultados demonstraram que o extrato sozinho não apresentou atividade antimicrobiana significativa, mas quando combinado com Gentamicina demonstrou ser um agente modificador da resistência de *S. aureus*. Já a fração de alcaloides demonstrou ter atividade antifúngica e antibacteriana, exceto para as cepas Gram-negativas. Além disso, a fração também demonstrou um efeito sinérgico com Gentamicina frente a *S. aureus* e com fluconazol frente a *C. krusei*. Estas associações demonstraram ter potencial para a formulação de medicamentos, pois as doses terapêuticas foram muito inferiores as CI₅₀ encontradas nos ensaios de toxicidade. Todavia, a fração de alcaloides demonstrou ser um melhor produto porque, além de ter demonstrado uma maior atividade, não apresentou antagonismos com nenhuma das drogas testadas.

Palavras-chave: Bioprospecção, alcaloides tropânicos, modificação da resistência.

Abstract

Faced with the problem of infectious diseases, especially those caused by antibiotic resistant microorganisms, many efforts have been made in order to treat these infections successfully. Bioprospecting research has been gaining prominence in this scenario, since many studies involving natural products and conventional drugs have shown effective results in modifying the microbial resistance. *Erythroxylum revolutum* is endemic to Northeastern Brazil and used by traditional peoples as an aphrodisiac and to treat heart problems. It is a source of molecules of medical interest. The phytochemistry of the genus to which it belongs is composed of alkaloids, mainly tropanics, flavonoids and terpenoids, molecules with a vast diversity of biological activities proven. The objective of this work is to highlight the value of conservation of *E. revolutum* species as a source of bioactive molecules of interest for pharmacology. The results of this research are divided into three articles. The first is a systematic review of popular uses and the pharmacological potential of the genus. The second is a research paper on the effects of ethanolic extract and alkaloid fraction of *E. revolutum* on sensitive and resistant bacteria, alone and combined with conventional antibiotics. The third and final article tests the effects of ethanolic extract and alkaloids fraction of *E. revolutum* against *Candida* species alone and combined with the antifungal fluconazole. Phytochemical prospecting and a toxicity test were also performed for both products, ethanolic extract and fraction of alkaloids. Our results demonstrated that the extract alone did not present significant antimicrobial activity, but when combined with Gentamicin, it was shown to be a resistance modifying agent of *S. aureus*. The alkaloids fraction showed antifungal and antibacterial activity, except for Gram-negative strains. In addition, the fraction also demonstrated a synergistic effect with Gentamicin versus *S. aureus* and with fluconazole versus *C. krusei*. These associations have been shown to have potential for drug formulation since the therapeutic doses were much lower than the IC₅₀ found in the toxicity assays. However, the alkaloid fraction proved to be a better product because, in addition to having demonstrated a greater activity, it did not present antagonism with any of the drugs tested.

Keywords: Bioprospecting, tropane alkaloids, resistance modification, synergism.

Lista de figuras

Referencial Teórico

| | |
|---|----|
| Figura 1- Distribuição da família Erythroxylaceae | 26 |
| Figura 2- Caracteres morfológicos marcantes na família Erythroxylaceae. (A) Folha de <i>Erythroxylum caatingae</i> . (B) Folha de <i>Erythroxylum citrifolium</i> . (C) Folha de <i>Erythroxylum nummularia</i> . (D) Fruto de <i>E. caatingae</i> . (E) Fruto de <i>Erythroxylum citrifolium</i> . (F) Estípula de <i>E. nummularia</i> . (G) Estípula de <i>Erythroxylum paufferense</i> . (H) Estípula de <i>Erythroxylum passerinum</i> | 26 |
| Figura 3- Alcalóides tropânicos isolados de <i>Erythroxylum caatingae</i> . (A) 3 α , 6 β dibenxoiloxitropano. (B) Catuabina B..... | 28 |
| Figura 4- Diterpenos isolados de <i>Erythroxylum passerinum</i> e <i>Erythroxylum nummularia</i> | 28 |
| Figura 5- Flavonoides isolados de <i>Erythroxylum subrotundum</i> . (A) Quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo. (B) 5,7,4'-hidroxiflavona 3-O- α -L-raminosídeo..... | 28 |
| Figura 6- Estrutura molecular da atropina (A) e da escopolamina (B)..... | 29 |
| Figura 7- Flavonoide [Campferol 4'-O-(Ramnosil)-Glucosídeo] extraído de <i>Erythroxylum</i> sp.. | 30 |
| Figura 8- Arbusto da espécie <i>Erythroxylum revolutum</i> Mart..... | 32 |
| Figura 9- Mapa de ocorrência de <i>Erythroxylum revolutum</i> . Registros para os Estados em destaque: Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe..... | 33 |
| Figura 10- Alguns caracteres morfológicos de <i>Erythroxylum revolutum</i> . Da esquerda para a direita: drupa; lâmina foliar; estípula, vista abaxial; flor brevístila, corola removida..... | 33 |
| Figura 11- Detalhe da inserção da estípula no pecíolo de <i>Erythroxylum revolutum</i> (cicatriz hachurada). | 34 |
| Figura 12- Diterpenos isolados de <i>Erythroxylum revolutum</i> . (A) Ent-cauran-16-eno. (B) 13-hidroxi-8(17),14-labdadieno. (C) Ent-cauran-16-en-3 β -ol. (D) Ent-3-oxo-13-hidroxi-8(17),14-labdadieno. (E) Ent-cauran-16 β , 17-diol..... | 34 |
| Figura 13- Estrutura molecular do Esteviol..... | 36 |

Artigo II

| | |
|---|----|
| Figura 1- Cromatograma CG / EM mostrando dois picos relacionados aos dois alcaloides tropânicos identificados na fração de alcaloides das folhas de <i>Erythroxylum revolutum</i> : (A) 3,6-diacetoxitropano, com 87,77% de abundância relativa; (B) 3-acetoxi-6-hidroxi-tropano, com uma abundância relativa de 12,93%. RT: tempo de retenção..... | 84 |
|---|----|

Figura 2- Concentração Inibitória Mínima (CIM) de antibióticos: (A) gentamicina (Gen), (B) norfloxacin (Nor) e (C) eritromicina (Ery) isolada ou combinada com o extrato etanólico bruto de *E. revolutum* (ERE) ou com a fração de alcaloides *E. revolutum* (AF). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão dos valores de CIM de três repetições (* P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001 e **** P <0,0001, ANOVA de duas vias e teste de Tukey).....85

Artigo III

Figura 1- Cromatograma do EER (Extrato de *Erythroxyllum revolutum*) apresentando com fator de retenção semelhante ao padrão de rutina105

Figura 2- Cromatograma do EER (Extrato de *Erythroxyllum revolutum*) apresentando pico com fator de retenção semelhante ao padrão de ácido gálico.....105

Figura 3- Cromatograma CG / EM mostrando dois picos relacionados aos dois alcaloides tropânicos identificados na fração de alcaloides das folhas de *Erythroxyllum revolutum*: (A) 3,6-diacetoxitropano, com 87,77% de abundância relativa; (B) 3-acetoxi-6-hidroxi-tropano, com uma abundância relativa de 12,93%. RT: tempo de retenção106

Figura 4- Curvas de crescimento de espécies de *Candida* na presença do EER (extrato etanólico de *Erythroxyllum revolutum*) e da FAT (fração dos alcaloides totais). (A) Ensaio com *C. albicans* (EER: $CI_{50} = 4.417$ e $R^2 = 0,81$; FAT: $CI_{50} = 2.735$ e $R^2 = 0,68$) . (B) Ensaio com *C. tropicalis* (EER: $CI_{50} = 3.764$ e $R^2 = 0,77$; FAT . $CI_{50} = 353$ e $R^2 = 0,82$). (C) Ensaio com *C. krusei* (EER: $CI_{50} = 2.954,0$ e $R^2 = 0,77$; FAT: $CI_{50} = 595$ e $R^2 = 0,81$).....107

Figura 5- Efeitos do EER (extrato etanólico de *Erythroxyllum revolutum*) sozinho e em combinação com o fluconazol contra o crescimento de *Candida albicans* (A), *Candida tropicalis* (B) e *Candida krusei* (C) 108

Figura 6- Efeitos da FAT (fração dos alcaloides totais) de *Erythroxyllum revolutum* sozinha e em combinação com o fluconazol contra o crescimento de *Candida albicans* (A), *Candida tropicalis* (B) e *Candida krusei* (C)110

Figura 7- Efeitos do EER (extrato etanólico) e da FAT (fração dos alcaloides totais) de *Erythroxyllum revolutum* em tecido hepático de *Mus musculus* pelo ensaio *ex vivo* utilizando o reagente MTT. Resultados da FAT: $IC_{50} = 6.752,0 \mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,79$ e $\alpha = 0,05$). Resultados do EER: $IC_{50} = 1.139,0 \mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,87$ e $\alpha = 0,05$)112

Apêndice

| | |
|--|-----|
| Figura 1- Material vegetal. (A) Folhas frescas. (B) Folhas secas trituradas. | 122 |
| Figura 2- Extração a frio. (A) Submersão do material vegetal seco em etanol. (B) Extração por 72h | 122 |
| Figura 3- Filtração e concentração do EER (extrato de <i>Erythroxylum revolutum</i>). (A) Filtragem a vácuo. (B) Rotaevaporação com bombas de pressão reduzida. (C) Rotaevaporador ajustado para 40°C..... | 123 |
| Figura 4- Concentração do EER (extrato de <i>Erythroxylum revolutum</i>) em banho-maria. (A) Ajuste do banho-maria para 40°C. (B) Monitoramento da temperatura com termômetro de mercúrio..... | 123 |
| Figura 5- Extração ácida. (A) Acidificação do EER (Extrato de <i>Erythroxylum revolutum</i>) até o pH 2,0. (B) Separação em funil com acetato de etila | 124 |
| Figura 6- Extração básica. (A) Basificação da fase aquosa do EER (Extrato de <i>Erythroxylum revolutum</i>) até o pH 9,0. (B) Separação em funil com acetato de etila. | 124 |
| Figura 7- Secagem da FAT: Adição de sulfato de sódio anidro..... | 125 |
| Figura 8- Concentração da FAT (Fração dos Alcaloides Totais). (A) Concentração em evaporador rotativo a 40°C. (B) FAT após o processo de rotaevaporação. (C) Retirada do solvente restante em banho-maria.. | 125 |
| Figura 9- Partição do EER (Extrato de <i>Erythroxylum revolutum</i>) para obtenção da FAT (Fração dos Alcaloides Totais)..... | 126 |
| Figura 10- Resultado do teste qualitativo para alcaloides pelo reagente Dragendorff no EER (Extrato de <i>Erythroxylum revolutum</i>)..... | 127 |
| Figura 11- Resultado do teste qualitativo para alcaloides pelo reagente Dragendorff na FAT (Fração dos Alcaloides Totais)..... | 127 |
| Figura 12- Resultado do teste qualitativo para flavonoides para o EER (Extrato de <i>Erythroxylum revolutum</i>)..... | 128 |
| Figura 13- Preparação das amostras para a CLAE. (A) Homogeneização. (B) Filtração. | 129 |
| Figura 14- Aparelho utilizado para a CLAE. | 130 |
| Figura 15- Preparação das soluções para o ensaio de toxicidade. (A) Ajuste do pH tampão fosfato salino. (B) Frascos com o reagente MTT e solução de solubilização ao centro | 131 |
| Figura 16- Esquema de diluição dos produtos utilizados no teste de toxicidade pelo reagente MTT..... | 132 |
| Figura 17- Pesagem dos eppendorfs das soluções-teste para o ensaio de toxicidade..... | 132 |
| Figura 18- Fígado imerso em tampão fosfato salino sobre plataforma de gelo. | 133 |

| | |
|---|-----|
| Figura 19- Incubação pré-teste das fatias com as soluções-teste em banho-maria a 37°C. | 133 |
| Figura 20- Adição de MTT nas amostras..... | 134 |
| Figura 21- Adição de dimetilsulfóxido (DMSO) nas amostras. | 134 |
| Figura 22- Esquema de pipetagem para o ensaio <i>ex vivo</i> pelo reagente MTT..... | 135 |
| Figura 23- Leitura da absorbância no ELISA. (A) Placa de 96 poços contendo as amostras. (B) Resultado da leitura. | 135 |
| Figura 24- Semeio das cepas bacterianas. (A) Placas de Petri contendo o meio HIA. (B) Placas contendo as cepas após incubação. | 137 |
| Figura 25- Preparação dos inóculos para os ensaios antibacterianos. (A) Retirada de uma alíquota da colônia. (B) Transferência para solução salina. (C) Análise da turbidez das células em suspensão..... | 137 |
| Figura 26- Diluição dos produtos para os ensaios antibacterianos. (A) Pesagem do material. (B) Tubos falcon contendo os produtos diluídos. | 138 |
| Figura 27- Preparação dos Eppendorfs para os ensaios antibacterianos. (A) Adição do meio de cultura. (B) Adição dos inóculos..... | 138 |
| Figura 28- Esquema de microdiluição para os ensaios antibacterianos..... | 139 |
| Figura 29- Placa de Petri do ensaio antibacteriano pronta para incubação..... | 139 |
| Figura 30- Leitura da CIM (Concentração Inibitória Mínima) do ensaio de modificação da resistência bacteriana com o reagente resazurina. | 140 |
| Figura 31- Placas de Petri contendo as cepas fúngicas incubadas em meio sólido. | 141 |
| Figura 32- Inoculação das cepas fúngicas em solução salina. | 141 |
| Figura 33- Diluição dos produtos para os ensaios antifúngicos (adição de DMSO e água destilada). | 142 |
| Figura 34- Preparação dos Eppendorfs para os ensaios antifúngicos (adição de meio de cultura e inóculo)..... | 142 |
| Figura 35- Esquema de microdiluição para os ensaios antifúngicos. | 143 |
| Figura 36- Leitura da CI ₅₀ para os ensaios antifúngicos. (A) Placa de Petri após incubação pronta para a leitura da absorbância. (B) Realização da leitura pelo ELISA (Termoplate®). | 143 |
| Figura 37- Determinação da CI ₅₀ para os ensaios antifúngicos. (A) Haste estéril após ser mergulhada no poço é subclavada em Placa de Petri. (B) Placa de Petri contendo meio de cultura..... | 144 |
| Figura 38- Leitura da CFM (Concentração Fungicida Mínima). (A) Placa de Petri logo após a inoculação do conteúdo dos poços. (B) Placa de Petri após incubação | 144 |

Lista de tabelas

Referencial Teórico

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Características físico-químicas dos diterpenos de <i>Erythroxylum revolutum</i> identificados por Oliveira (2012)..... | 35 |
|--|----|

Artigo I

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Usos populares de <i>Erythroxylum</i> para fins medicinais..... | 47 |
| Tabela 2- Metabólitos secundários isolados e caracterizados em <i>Erythroxylum</i> | 51 |
| Tabela 3- Atividades terapêuticas investigadas em produtos naturais provindos de espécies de <i>Erythroxylum</i> | 60 |

Artigo II

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Cepas bacterianas utilizadas para os ensaios de avaliação dos efeitos antibacterianos e modificador da resistência. | 79 |
| Tabela 2- Resultado da prospecção fitoquímica no extrato etanólico (EER) e na fração de alcaloides (FAT) de <i>Erythroxylum revolutum</i> | 84 |
| Tabela 3- Atividade antibacteriana do extrato etanólico (EER) e da fração de alcaloides (FAT) de <i>Erythroxylum revolutum</i> contra cepas comuns e resistentes | 85 |

Artigo III

| | |
|--|-----|
| Tabela 1- Resultado da prospecção fitoquímica no EB (Extrato Bruto de <i>Erythroxylum revolutum</i>) e na FAT (Fração dos Alcaloides Totais)..... | 104 |
| Tabela 2- Quantificação de ácido gálico e rutina no EER através da análise por CLAE... .. | 106 |
| Tabela 3- Resultado da CFM (Concentração Fungicida Mínima) do EER (Extrato Etanólico de <i>Erythroxylum revolutum</i>) e da FAT (Fração dos Alcaloides Totais)..... | 108 |
| Tabela 4- Resultado da CFM da modificação da resistência fúngica pelo EER (extrato etanólico bruto de <i>Erythroxylum revolutum</i> e pela FAT (fração dos alcaloides totais) em combinação com o fluconazol | 111 |

Apêndice III

| | |
|---|-----|
| Tabela 1- Parâmetros do gradiente de concentração utilizado para o sistema eluente da CLAE..... | 130 |
|---|-----|

Sumário

| | |
|--|------------|
| Resumo..... | 09 |
| Abstract..... | 10 |
| Lista de Figuras..... | 11 |
| Lista de Tabelas..... | 15 |
| 1. Introdução..... | 19 |
| 2. Referencial teórico..... | 21 |
| 2.1. As Pesquisas em Bioprospecção..... | 21 |
| 2.2. Os Produtos Naturais e a Etnofarmacologia..... | 22 |
| 2.3. O Parque Estadual Mata da Pimenteira e o Potencial da Biodiversidade da Caatinga..... | 23 |
| 2.4. O Desenvolvimento de antimicrobianos a partir de fontes naturais..... | 24 |
| 2.5. Considerações sobre a família Erythroxylaceae..... | 25 |
| 2.5.1. Aspectos Botânicos..... | 26 |
| 2.5.2. Aspectos Fitoquímicos..... | 27 |
| 2.5.3. Etnofarmacologia e Atividades Biológicas..... | 30 |
| 2.6. Considerações sobre <i>Erythroxylum revolutum</i> Mart..... | 32 |
| 3. Referências bibliográficas..... | 36 |
| 4. Artigos científicos..... | 45 |
| 4.1- Artigo I: Uso tradicional, Fitoquímica e Farmacologia do gênero <i>Erythroxylum</i> : Uma Revisão Sistemática com enfoque na Conservação da Biodiversidade Molecular..... | 45 |
| 4.2- Artigo II: Efeito Antibacteriano e Modificador da Resistência Bacteriana do Extrato Bruto e da Fração Alcaloídica de <i>Erythroxylum revolutum</i> Mart. em Combinação com Antibióticos Convencionais..... | 77 |
| 4.3- Artigo III - Atividade Antifúngica e Modificadora da Resistência Fúngica do extrato etanólico e da fração de alcaloides de <i>Erythroxylum revolutum</i> Mart. (Erythroxylaceae) em combinação com o Fluconazol..... | 98 |
| 5. Considerações Finais..... | 121 |
| 6. APÊNDICE – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS..... | 122 |
| 6.1 Protocolo de Extração do EER (Extrato de <i>Erythroxylum revolutum</i>)..... | 122 |
| 6.2 Protocolo de extração da FAT (Fração dos Alcaloides Totais) | 123 |

| | |
|---|------------|
| 6.3 Protocolo de Identificação e Quantificação de Metabólitos Secundários..... | 126 |
| 6.4 Protocolo do teste de toxicidade <i>ex vivo</i>..... | 131 |
| 6.5 Protocolo do Teste Antibacteriano e Modificador da Resistência..... | 137 |
| 6.6 Protocolo do Teste Antifúngico e Modificador da Resistência..... | 141 |

1. Introdução

A aquisição de resistência microbiana aos medicamentos tornou-se um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, causada em grande parte pelo uso indiscriminado de antibióticos. A luta contra estas patógenos ficou conhecida como “Guerra não-sustentável”, porque estes conseguem adquirir resistência a uma taxa muito mais alta do que são produzidos novos medicamentos (BONOMO e SZABO, 2006). Este problema foi intensificado ainda mais a partir do surto de AIDS na década de 1980, no qual milhares de pacientes imunodeprimidos chegaram a óbito tendo adquirido estas enfermidades no ambiente hospitalar, causadas tanto por bactérias quanto por fungos (ODDS et al., 2003; BONOMO e SZABO, 2006).

Diante do exposto, a incessante busca por novos princípios ativos é fundamental para o tratamento e cura de diversas enfermidades e doenças infecciosas, muitas delas sem tratamento nos dias atuais (MONTANARI e BOLZANI, 2001). Apesar das intensas pesquisas na área, existe a preocupação por parte de alguns autores de um retorno à era pré-antibiótico, o que vem fazendo com que a indústria farmacêutica volte cada vez mais os olhos para as pesquisas com produtos naturais (BAQUERO e BLÁZQUEZ, 1997).

A investigação do sinergismo entre extratos bioativos de plantas e drogas antimicrobianas é uma nova vertente dentro da fitoterapia. Muitos compostos de plantas, embora não possuam atividade isoladamente, demonstraram potenciais sinergismos contra cepas multirresistentes quando combinados a determinadas drogas (CHANDA e RAKHOLIYA, 2011). Estas interações promovem vantagens significativas no tratamento de diversas infecções, como o aumento da biodisponibilidade de agentes livres, a diminuição da dose para a obtenção dos efeitos do medicamento e a redução de efeitos colaterais (INUI et al., 2007).

Uma abordagem holística é extremamente necessária do ponto de vista ecológico, porque além do princípio ativo é necessário que o fármaco seja economicamente viável e que sua fonte seja administrada de forma sustentável. As pesquisas em bioprospecção permitem esta abordagem, visto que agrega valor econômico aos materiais biológicos, ressalta o potencial dos ecossistemas naturais para a terapêutica moderna e salientam a importância do envolvimento das comunidades tradicionais que fazem uso dessas fontes para que seja possível a conservação das mesmas (AZEVEDO, 2003; RAMAWAT et al., 2009).

Neste estudo testamos a hipótese de que *Erythroxylum revolutum* Mart. produz moléculas capazes de inibir e/ou anular o mecanismo de resistência de microrganismos

patógenos, potencializando o efeito de antimicrobianos utilizados na terapêutica moderna. Com isto pretendemos ressaltar o valor da espécie para a terapêutica moderna e salientar a importância da conservação dos ecossistemas da Caatinga como fonte de moléculas bioativas de interesse para a farmacologia.

2. Referencial teórico

2.1. As Pesquisas em Bioprospecção

O termo bioprospecção é utilizado para designar a pesquisa de qualquer material biológico que tem por objetivo explorar os seus recursos genéticos garantindo o seu uso sustentável, a distribuição justa e igualitária de seus benefícios, a regulamentação de tecnologias novas e a adoção de estratégias de conservação (AZEVEDO, 2003). As pesquisas em bioprospecção surgiram com o objetivo de incentivar o uso sustentável da biodiversidade e sua conservação e, atualmente, numerosos grupos acadêmicos estão ativos nestas pesquisas. Embora ainda sejam necessários incentivos financeiros para o desenvolvimento de fármacos, seja por parte do poder público ou de parcerias com empresas privadas, conhecer o potencial da nossa biodiversidade ajuda a diminuir a biopirataria e a garantir que os benefícios circulem internamente, fortalecendo o comércio local (HARVEY e GERICKE, 2011).

O mercado farmacêutico mundial movimentava bilhões de dólares anualmente, sendo 40% dos medicamentos disponíveis provindos de fontes naturais (25% provindos de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais). Além disso, os antibióticos e as drogas anticancerígenas chegam a compor 70% desse mercado (CALIXTO, 2003).

A fitoterapia ganhou destaque como alternativa no tratamento das mais diversas enfermidades, sobretudo nos países em desenvolvimento como o Brasil, onde existe grande acessibilidade da população às plantas medicinais e onde geralmente os serviços públicos de saúde são limitados (AGRA et al., 2007).

Em meio aos paradigmas atuais, entre países em desenvolvimento que não tem condições de pagar o longo caminho para a descoberta de novos fármacos usando compostos puros e países desenvolvidos na tentativa de descobrir novas drogas, a pesquisa de medicamentos a partir de plantas medicinais passou a ter uma abordagem multifacetada envolvendo etnobiologia, botânica, fitoquímica e técnicas de modificação molecular (RAMAWAT et al., 2009; BALUNAS e KINGHORN, 2005).

Neste contexto, surge na década de 1970 uma corrente filosófica socioambientalista e difunde-se mundialmente, chegando ao Brasil a partir da década de 1990 e intensificando os debates sobre os aspectos de direito às áreas protegidas legalmente. Esta corrente é baseada no desenvolvimento sustentável que busca a justiça social para as populações tradicionais, que têm como elementos de afirmação e direitos fundamentais os conhecimentos tradicionais e o acesso aos recursos naturais (SANTILLI, 2009). Segundo os seus adeptos, a conservação

biológica só é possível com a fixação das famílias de agricultores e a adequação de suas práticas aos objetivos das áreas legalmente protegidas, bem como a melhoria da qualidade de vida e a valorização dessas comunidades. Para defender esta “Hipótese da Permanência”, Ewert et al. (2013) mostra um estudo de caso onde o sistema da Cooperafloresta se demonstrou eficaz para o desenvolvimento sustentável de comunidades tradicionais e remanescentes de quilombolas e indígenas, baseando-se em argumentos agroecológicos.

As unidades de conservação (UCs) foram criadas *a priori* com o intuito de proteger essas áreas naturais unicamente para a contemplação, mas posteriormente passou-se a considerar o valor da biodiversidade *per se*. No âmbito brasileiro as UCs são estabelecidas pelo Governo Federal e pelas unidades da federação em seu âmbito administrativo, podendo ser de proteção integral ou de uso sustentável (RYLANDS e BRANDON, 2005).

Os impactos ambientais causados por populações humanas estão entre os principais agentes causadores da perda de biodiversidade, o que é extremamente preocupante, pois sendo esta imprescindível para a manutenção dos ecossistemas naturais e, conseqüentemente, para a vida e atividades humanas, estratégias de conservação são urgentes e fundamentais (CHIVIAN e BERNSTEIN, 2008).

Como resultado dos intensos debates a respeito, o SINUC (Sistema Nacional de Unidades de Conservação) passa a reconhecer algumas espécies de UCs (Unidades de Conservação) em que as populações humanas podem permanecer, desde que sigam as prerrogativas do plano de manejo da UC e os objetivos para os quais ela foi criada (MARQUES e RANIERI, 2012).

Por fim, o conhecimento gerado acerca dos recursos provindos da biodiversidade pode gerar impactos nos mais variados contextos (econômicos, sociais e ambientais) que, devido à grande complexidade destas questões, podem ser positivos ou negativos. Desta forma, as pesquisas em bioprospecção vêm ganhando destaque, visto que exige dos pesquisadores um envolvimento maior em todas as questões que permeiam a utilização destes produtos.

2.2. Os Produtos Naturais e a Etnofarmacologia

Os produtos naturais são qualquer material de origem biológica que fornece moléculas bioativas com propriedades químicas definidas. Elas podem ser únicas para uma espécie ou comuns a espécies filogeneticamente relacionadas (MANN, 1987). Estes produtos têm sido utilizados para fins medicinais desde os primórdios da humanidade, onde as civilizações

Egípcia, Chinesa e Greco-Romana se destacaram. Este conhecimento é fruto de milênios de experimentação e faz parte da cultura de povos tradicionais do mundo inteiro, sendo repassada geração após geração (VIEGAS JR. et al., 2006; PHILLIPSON, 2001).

Na medida em que o mundo torna-se cada vez mais tecnológico e globalizado, grupos étnicos diferentes passaram a aprender uns com os outros, contribuindo para o conhecimento de compostos químicos e suas propriedades biológicas, que inspiraram a síntese orgânica clássica com modelos moleculares que se tornaram a base para os estudos da relação estrutura-atividade (VIEGAS JR. et al., 2006).

Milhares de metabólitos foram isolados e caracterizados com apenas 10% da biodiversidade mundial tendo sido estudada e a grande maioria ainda não foi testada biologicamente. O Brasil, por se tratar de um país líder em biodiversidade, tem a capacidade de desenvolver programas bem sucedidos para o desenvolvimento de medicamentos a partir da interação indústria-universidade. Há exemplos de países, como China e Índia, onde o desenvolvimento destes programas foi bem-sucedido, fortalecendo o Produto Interno Bruto (PIB) (CALIXTO, 2003).

2.3. O Parque Estadual Mata da Pimenteira e o Potencial da Biodiversidade da Caatinga

O Parque Estadual Mata da Pimenteira é uma unidade de proteção integral criada em uma área de caatinga no município de Serra Talhada-PE com o objetivo de preservar seus ecossistemas naturais. Entre os objetivos da UC, estão o desenvolvimento de pesquisas científicas, atividades de educação ambiental e turismo ecológico. A Caatinga está entre os domínios mais ameaçados do Brasil, com o menor número de UCs e uma biota altamente rica quando comparada a outros ecossistemas que estão expostos às mesmas condições de solo e clima, sendo ainda uma das regiões menos protegidas do país (MMA, 2018). Ela abrange o interior do nordeste e o norte do estado de Minas Gerais, ocupando uma área de 900.000 km². Nesta região predomina um clima semiárido (caracterizado pela baixa umidade e baixo índice pluviométrico) e a fitofisionomia de caatinga-estépica, mas também comporta algumas áreas de vales, chapadas, brejos de altitude, entre outras, formando um mosaico de paisagens (MMA, 2018).

Vive neste domínio cerca de 20 milhões de pessoas (em torno de 10% da população do país), com a maioria dos habitantes possuindo renda per capita e expectativa de vida baixas. Peculiarmente seus habitantes possuem uma estreita relação com o ambiente e um conhecimento rico acerca dos usos dos recursos naturais disponíveis, resultado da resistência dessas populações às adversidades climáticas e econômicas (QUEIRÓZ et al., 2006). Alguns

levantamentos etnobotânicos têm apontado uma quantidade significativa de espécies da Caatinga utilizadas pelas populações locais para fins medicinais (AGRA et al., 2007; SILVA et al., 2015).

O Programa de Biodiversidade, que fez parte do projeto do 'Instituto do Milênio do Semi-Árido' (IMSEAR), encontrou uma alta riqueza de espécies na região. Outro programa do mesmo projeto, o Programa de Bioprospecção, extraiu 536 componentes de 90 espécies de plantas nativas da região semiárida, muitos desses componentes eficazes contra *Leishmania*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, entre outros. Também foram isoladas 103 substâncias puras, incluindo terpenoides, flavonoides, alcaloides, etc., que também demonstraram atividades terapêuticas. Além disso, 14 novas substâncias foram descobertas e 20 derivados semissintéticos foram produzidos (QUEIRÓZ et al., 2006).

Nesse sentido, os ecossistemas da caatinga demonstram um imenso potencial para a bioprospecção, visto que a maioria da sua biodiversidade molecular continua inexplorada e, baseando-se nos princípios do desenvolvimento sustentável, esta será decisiva para o desenvolvimento da região e do país.

2.4. O Desenvolvimento de antimicrobianos a partir de fontes naturais

As plantas desenvolveram através de seleção natural a capacidade de produzir metabólitos secundários que promovem a sua defesa bioquímica, sendo capazes de agir contra agentes infecciosos. Estas propriedades antimicrobianas são conhecidas há séculos, mas só recentemente foram comprovadas cientificamente (JANSEN et al., 1987).

Muitos estudos sobre as propriedades antibacterianas e antifúngicas de produtos provindos do metabolismo vegetal vêm sendo relatados em países com tradição em utilização de plantas medicinais e flora altamente diversificada e, tais como Brasil, México e Cuba (MARTÍNEZ et al., 1996; NAVARRO et al., 1996; DUARTE et al., 2005).

O potencial antimicrobiano dos produtos naturais é mensurado através da determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima). Alguns pesquisadores consideram CIMs abaixo de 500 µg/mL inibições fortes, CIMs entre 600 e 1500 µg/mL inibições moderadas e CIMs acima de 1.600 µg/mL inibições fracas. Todavia, é importante ressaltar que alguns autores consideram até mesmo valores maiores que 1.600 µg/mL uma boa inibição por se tratar de um agente natural, enquanto outros apenas consideram bons inibidores os que atingem valores similares aos de antibióticos de referência (ALIGIANS et al., 2001).

Outra questão relevante no desenvolvimento de antimicrobianos é o mecanismo evolutivo da aquisição de resistência. Na medida em que são produzidos novos agentes contra estes agentes infecciosos, estes continuam tentando invadir seus hospedeiros com uma alta taxa de mutação, adquirindo resistência a estes agentes e a “corrida armamentista” continua (FRANSWORTH et al., 1985). Desde a descrição de uma enzima inativadora de penicilina em *Escherichia coli* em 1940, a luta contra a aquisição de resistência pelos microorganismos se estende por décadas (ABRAHAM e CHAIN, 1940; WHO, 2014). O alto consumo de antibióticos é o fator principal para a aquisição de resistência a drogas por patógenos (humanos e animais), o que se tornou um dos casos de evolução biológica mais bem documentados e um dos maiores problemas de saúde pública tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento.

2.5. Considerações sobre a família Erythroxylaceae

A família Erythroxylaceae Kunth possui aproximadamente 240 espécies descritas e possui distribuição pantropical (Figura 1) (DALY, 2004).

A classificação da família é controversa e sofreu algumas alterações ao longo do tempo. Pela classificação de Cronquist (1981) ela pertencia à ordem Linales, mas posteriormente foi inserida na ordem Geraniales (LOIOLA et al., 2007). O “Angiosperm Phylogeny Group” propôs em 2003, que Erythroxylaceae e Rhizophoraceae fossem consideradas, opcionalmente, uma família. Isto devido ao estudo do gene *rbcL* (SCHWARZBACH e RICKLEFS, 2000) apoiado à caracteres morfológicos e anatômicos listados (DAHLGREN, 1988 *Apud* LOIOLA et al., 2007). Com isto, a família passa a pertencer à ordem Malpighiales.

A classificação do APG III acrescenta à ela o gênero *Aneulophus* Benth., além dos outros três que já faziam parte, *Nectaropetalum* Engl., *Pinacopodium* Exell e Mendonça e *Erythroxylum* P. Browne. Este último é o mais representativo em número de espécies e possui distribuição pantropical, enquanto os demais possuem número reduzido de espécies e distribuição restrita à África. Para os fins do presente estudo vamos considerar Erythroxylaceae separada de Rizophoraceae (LOIOLA et al. 2007).

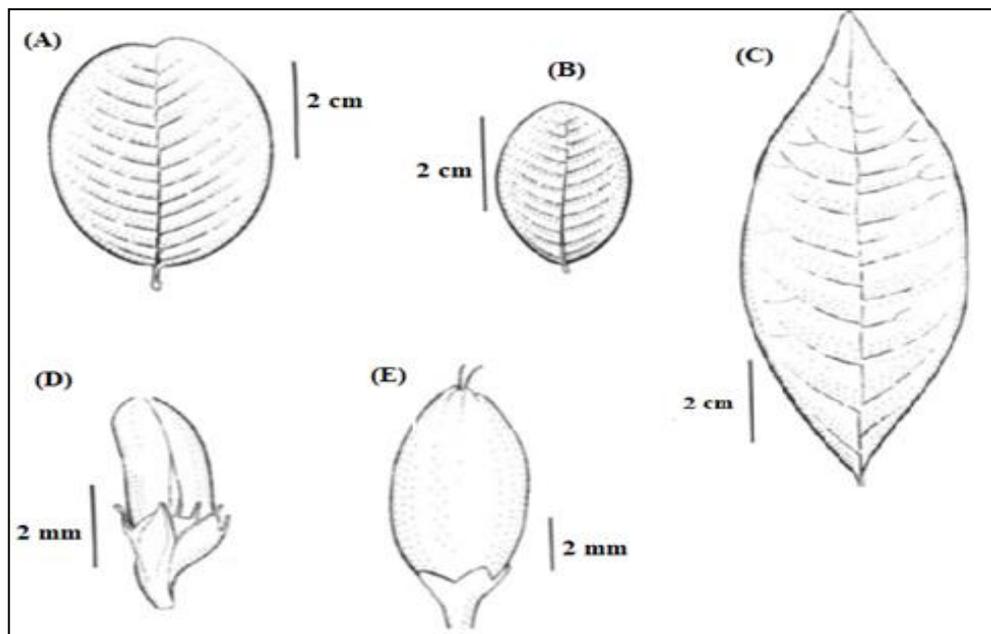


Figura 1: Distribuição da família Erythroxylaceae. Fonte: Adaptado de Angiosperm Phylogeny Website <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>.

2.5.1. Aspectos Botânicos

Com uma grande versatilidade ecológica, as espécies desta família sobrevivem em diversos habitats, que vão desde florestas tropicais até regiões semiáridas, sendo seu principal centro de diversidade e endemismo a América do Sul, onde se destacam o Brasil e a Venezuela (DALY, 2004; PLOWMAN, 2001 *Apud.* LOIOLA et al., 2007).

Entre os caracteres morfológicos que definem a família os mais marcantes são as folhas alternas, inteiras, estipuladas e pecioladas, flores surgindo de bractéolas escariosas pequenas, actinomorfas, com 5 pétalas livres e alternas com as sépalas (Figura 2) (LOIOLA et al., 2007; COSTA-LIMA et al., 2014).



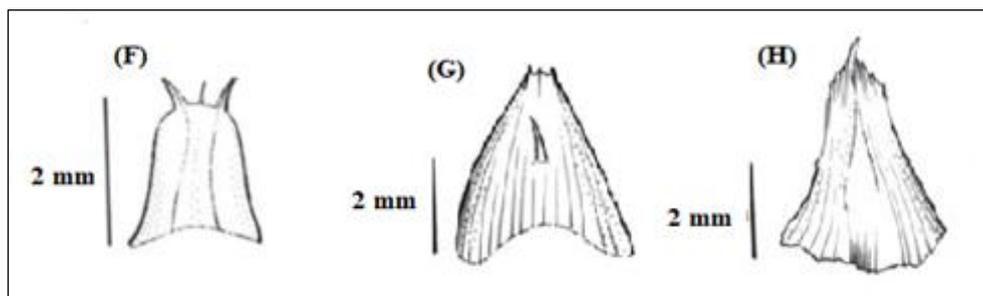


Figura 2: Caracteres morfológicos marcantes na família Erythroxylaceae. (A) Folha de *Erythroxylum caatingae*. (B) Folha de *Erythroxylum citrifolium*. (C) Folha de *Erythroxylum nummularia*. (D) Fruto de *E. caatingae*. (E) Fruto de *Erythroxylum citrifolium*. (F) Estípula de *E. nummularia*. (G) Estípula de *Erythroxylum paufferense*. (H) Estípula de *Erythroxylum passerinum*. Fonte: Adaptado de Loiola et al. 2007.

2.5.2. Aspectos Fitoquímicos

Os vegetais produzem uma grande diversidade de compostos orgânicos como produto dos metabolismos primário e secundário. O primário produz moléculas que estão diretamente ligadas a funções como desenvolvimento e crescimento (lipídeos, carboidratos, peptídeos, esteroides) e são comuns a todos os vegetais (TAIZ e ZEIGER, 2004; SANTOS, 2007). Já os compostos do metabolismo secundário, diferentemente do metabolismo primário, não está ligado ao desenvolvimento e crescimento, e sim a funções como defesa (contra infecções, herbívoros), atrativos (para polinizadores e dispersores), entre outras.

As rotas para a produção destes metabólitos (alcaloides, compostos fenólicos, antocianinas, etc) envolvem vias complexas resultante das interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação. Esta produção, governada por genes, é diretamente influenciada por diversos fatores, como hereditariedade, estágio de desenvolvimento e componentes bióticos e abióticos do ambiente (TAIZ e ZEIGER, 2004; CASTRO et al., 2004; SANTOS, 2001). Desta forma, a pressão seletiva sobre eles é muito maior, logo, são restritos a uma única espécie ou a grupos de espécies relacionadas filogeneticamente.

Segundo González-Garcia et al. (2005), entre os metabólitos secundários produzidos pela família Erythroxylaceae a classe predominante é a dos alcaloides com 54,7% dos registros (Figura 3), principalmente os tropânicos, mas terpenoides (Figura 4) e flavonoides (Figura 5) também estão significativamente presentes, representando 23,3% e 19,8%, respectivamente.

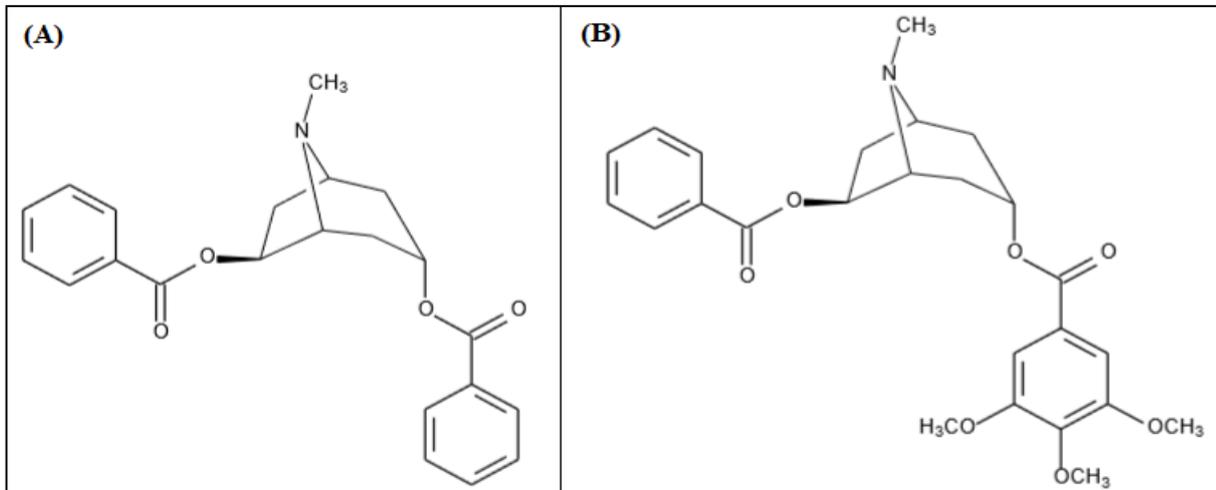


Figura 3: Alcalóides tropânicos isolados de *Erythroxylum caatingae*. (A) 3 α , 6 β dibenzoiloxitropano. (B) Catuabina B. Fonte: Adaptada Oliveira 2012.

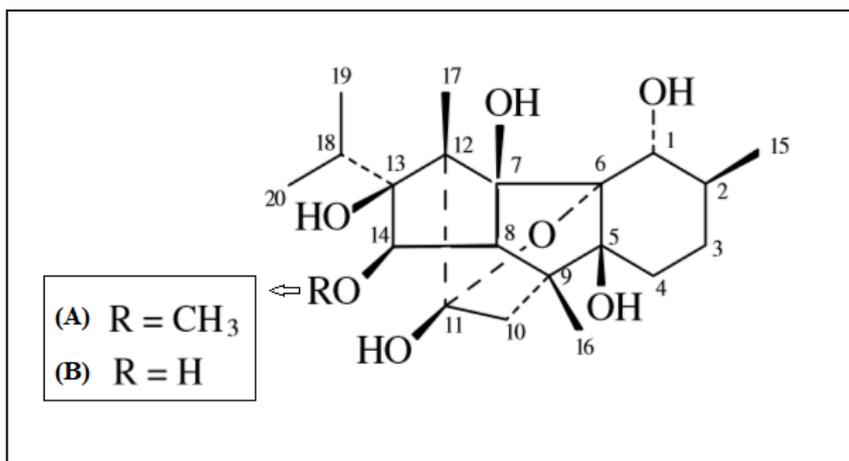


Figura 4: Diterpenos isolados de *Erythroxylum passerinum* e *Erythroxylum nummularia*. Fonte: Adaptada de Barreiros et al. 2007.

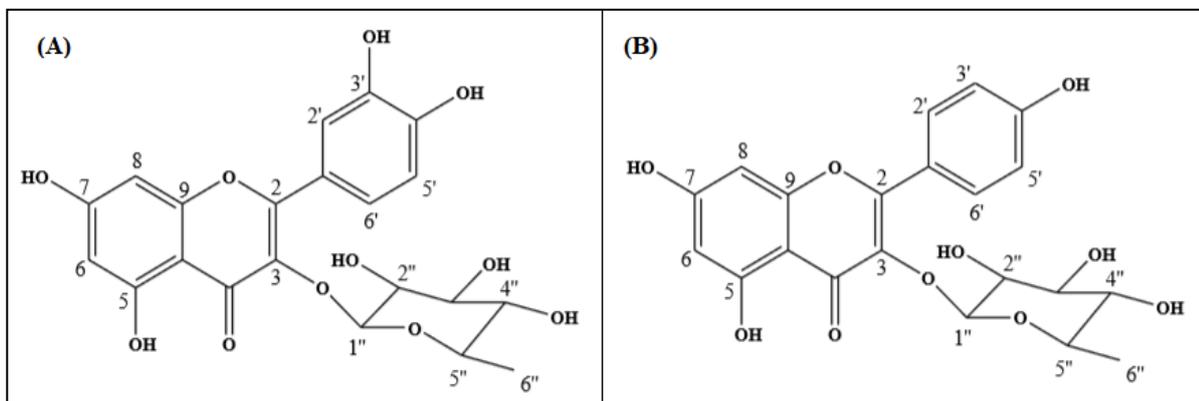


Figura 5: Flavonoides isolados de *Erythroxylum subrotundum*. (A) Quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo. (B) 5,7,4'-trihidroxi-flavona 3-O- α -L-raminosídeo. Fonte: Adaptada de Oliveira, 2012.

Entre os registros para alcaloides, no que concerne ao gênero como um todo, 93% são do tipo tropano, o que demonstra uma pronunciada predominância desta classe (GONZÁLEZ-GARCIA et al., 2005).

Os alcaloides são moléculas que possuem um nitrogênio heterocíclico e podem ser divididos em classes de acordo com seus precursores, abrangendo mais de 20 classes, como os tropânicos, os indólicos e os piperidínicos por exemplo. Eles são conhecidos pelos seus diversos efeitos farmacológicos em vertebrados, como as atividades analgésica e anti-inflamatória por exemplo. Sua presença nas plantas, assim como também a presença de outros metabólitos secundários, aumentam as taxas reprodutivas através das mais variadas atividades, como a atração de polinizadores, defesa contra herbivoria e reparo de danos pelo sistema antioxidante (MATSUURA e FETT-NETO, 2015).

Muitos medicamentos possuem alcaloides tropânicos em sua composição, a exemplo da atropina (Figura 6-A), que é utilizada como antiespasmódico, dilatador dos brônquios, estimulante cardíaco, contra intoxicações por organofosforados, como antídoto da eserina, aerocolina, entre outros (BACCHI, 2007) e da escopolamina (Figura 6-B), componente do Buscopan, também utilizada em espasmos do trato geniturinário e em anormalidades das vias biliares (RENNER et al., 2005). Outras atividades atribuídas a alcaloides tropânicos incluem estimulação do Sistema Nervoso Central, antissecretora, anestésica e antimicrobiana (BACCHI, 2007).

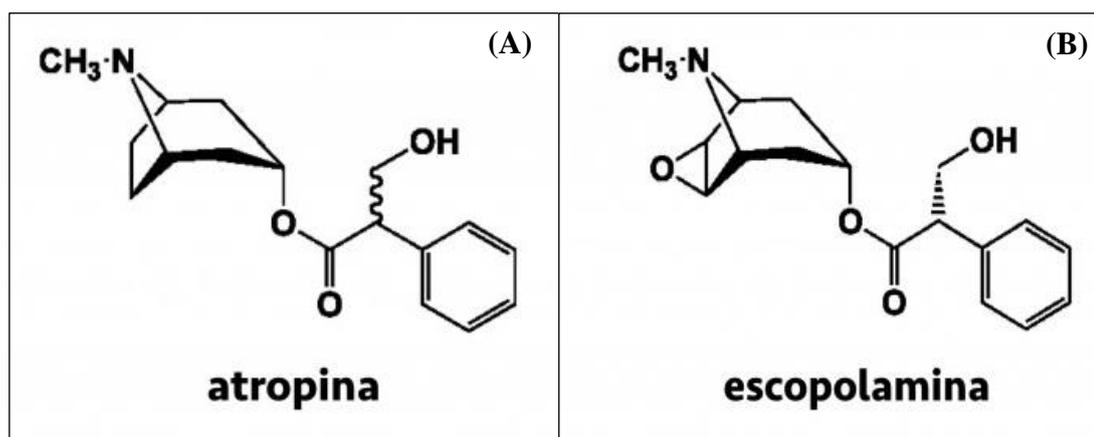


Figura 6: Estrutura molecular da atropina (A) e da escopolamina (B). Fonte: <http://cienciasfarmaceuticas2014.blogspot.com>.

Outras famílias vegetais também produzem alcaloides tropânicos, mas estas famílias não são necessariamente aparentadas, o que demonstra que a seleção natural produziu essas moléculas mais de uma vez ao longo da evolução. Vale a pena ressaltar o estudo de

Jirschitzka et al. (2012) demonstra como os alcaloides tropânicos evoluíram de forma independente nas famílias Erythroxylaceae e Solanaceae, um caso curioso de evolução convergente que resultou em estruturas bem parecidas, mas com suas peculiaridades.

Já para os flavonoides, embora os flavonóis sejam a maioria, existe uma distribuição maior entre outras subclasses: flavonóis (54%), flavononas (15,9%), flavanos (14,3%), isoflavonas (7,9%), flavonas (6,4%) e chalconas (1,6%) (GONZÁLEZ-GARCIA et al., 2005).

É importante ressaltar que a ocorrência de flavonoides nesta família é restrita ao gênero *Erythroxylum* e, outro aspecto importante para a quimiotaxonomia, é que os flavonoides quercetina e campferol, bem como seus derivados 3-glicosídeos (Figura 7) são considerados marcadores para as espécies deste gênero (INIGO e POMILIO, 1985).

Uma característica comum das espécies de *Erythroxylum* que ocorrem no Brasil, especialmente na região Nordeste, é a ocorrência de flavonoides e ésteres de ácidos graxos de triterpenos (BARREIROS et al., 2005).

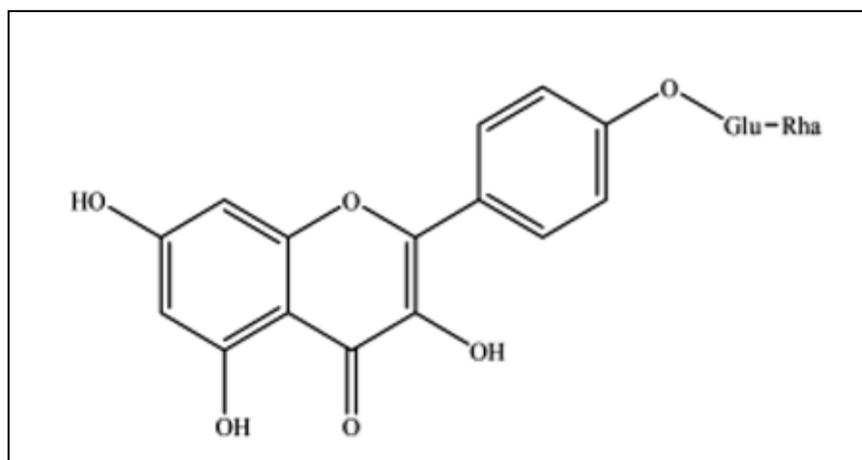


Figura 7: Flavonoide [Campferol 4'-O-(Ramnosil)-Glucosídeo] extraído de *Erythroxylum* sp. Fonte: Adaptada de Oliveira, 2012.

2.5.3. Etnofarmacologia e Atividades Biológicas

Povos de diferentes culturas produziram conhecimento acerca das propriedades biológicas deste *taxon* de forma independente e as utilizam até os dias atuais para as mais diversas enfermidades, como inflamações, problemas na pele como doenças fúngicas, acne, furúnculos (RASOANAIVO et al., 2005; PUENTES e HURRELL, 2015), problemas cardiovasculares (ALBUQUERQUE et al., 2007; AGRA et al., 2007), circulatórios,

gastrointestinais, hepáticos e dores de cabeça e garganta, entre outras (PUENTES e HURRELL, 2015; BARBOSA e PINTO, 2003).

O uso mais antigo de que se tem conhecimento data do Império Inca (séculos XIII a XV), onde *Erythroxylum coca* L. var *coca* era utilizada como anestésico e como estimulante (FAIRLEY, 2007).

Documentos etnobotânicos do Brasil relatam que desde o século XIX a medicina popular já tinha conhecimento dos efeitos viciantes e algumas noções da ação no SNC (sistema nervoso central) de *Erythroxylum coca* (GIORGETTI et al., 2011).

Apesar de a família ter se tornado amplamente conhecida devido à cocaína, as moléculas bioativas desta família vão muito além. A investigação desse conhecimento demonstrou resultados animadores para a farmacologia, com uma ampla variedade de propriedades, por exemplo, atividade antiinflamatória (TAKAHASHI et al., 1988), antimicrobiana (VILLANUEVA e NAKATA, 2010; WET, 2011; AGUIAR et al., 2012; VIOLANTE et al., 2012), antioxidante (BARREIROS et al., 2003; SOOBRAATTEE et al., 2008; CÓRDOVA et al., 2012), anti-herpética (GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2004; LOHEZIC et al., 1999), antinociceptiva (MAIA et al., 2014), antigenotóxica (LEYVA et al., 2003), antihipertensiva (LUCAS-FILHO, 2009; REIS et al., 2012), inibidora da resistência a múltiplas drogas (MI et al., 2002; SILVA et al., 2001) e antitumoral (GUSMAN et al., 2015; CHAVEZ et al., 2002; AGUIAR et al., 2012).

É importante ressaltar que muitas destas atividades foram atribuídas a alcaloides específicos e a maioria ainda carece de uma investigação mais acurada para determinar o(s) metabólito(s) envolvido(s) na atividade. A lista de espécies catalogadas continua crescendo e, à medida que cresce, também aumenta a quantidade de novos alcaloides isolados, reflexo da diversidade química desta família e predominância desta classe de moléculas (GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2005).

Outros alcaloides, entretanto, possuem efeitos adversos, como a cocaína, alcaloide extraído pela primeira vez de *Erythroxylum coca* Lam., mas que também é extraído de outras 16 espécies. Tendo sido utilizada durante muito tempo como medicamento, ela se transformou em um sério problema de saúde pública, causando dependência química porque age no sistema de recompensa cerebral (EVANS, 1996; WEINER, 1987 *Apud.* BACCHI, 2007). Portanto, os estudos envolvendo produtos naturais além de investigar os princípios ativos de interesse, devem também analisar a toxicidade destes compostos e seus efeitos sobre as vias metabólicas.

Um estudo conduzido por Medeiros (2013) indica que a seleção de plantas medicinais por populações locais é diretamente influenciada pela especificidade química de grupos taxonômicos, portanto, dado o conhecimento popular e empírico acerca deste *taxon*, as espécies desta família devem ser investigadas por se tratarem de uma fonte rica para a descoberta de novos fármacos.

2.6. Considerações sobre *Erythroxylum revolutum* Mart.

A espécie *Erythroxylum revolutum* Mart. (Figura 8) é uma planta endêmica da região nordeste do Brasil (Figura 9) onde é conhecida como “araçá-bravo” (AGRA et al., 2008). Ocorre em áreas semiáridas, onde predomina uma vegetação de caatinga *stricto sensu* e possui hábito arbustivo, com alguns indivíduos podendo chegar a arvoretas (LOIOLA et al., 2007).



Figura 8: Arbusto da espécie *Erythroxylum revolutum* Mart. Fonte: A autora, 2017.

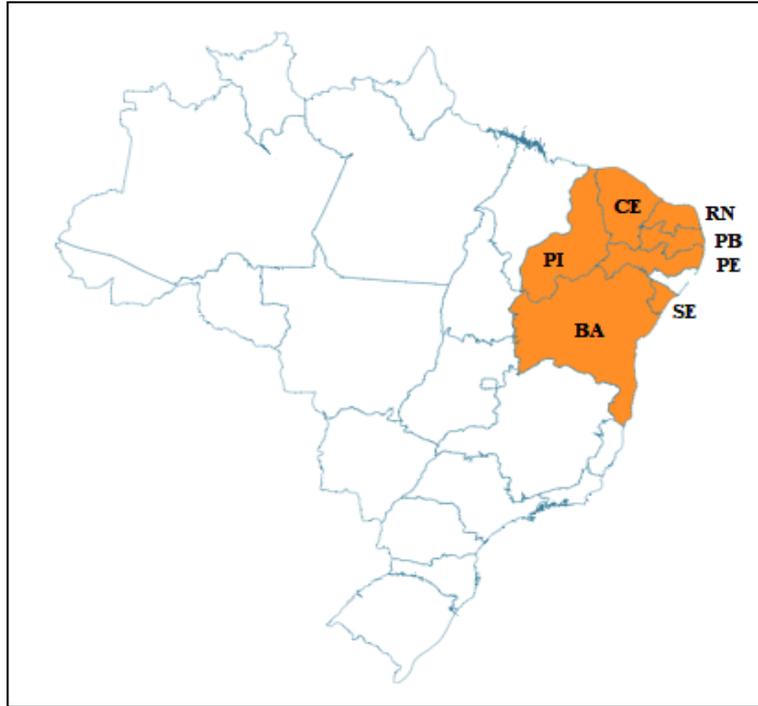


Figura 9: Mapa de ocorrência de *Erythroxylum revolutum*. Registros para os Estados em destaque: Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe. Fonte: Adaptado de Flora do Brasil <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>.

O que distingue esta espécie das demais são as estípulas estriado-nervadas, as flores subsésseis e a lâmina foliar coriácea, com margens revolutas frequentemente (Figuras 10 e 11), de onde deriva seu nome científico (LOIOLA et al., 2007).

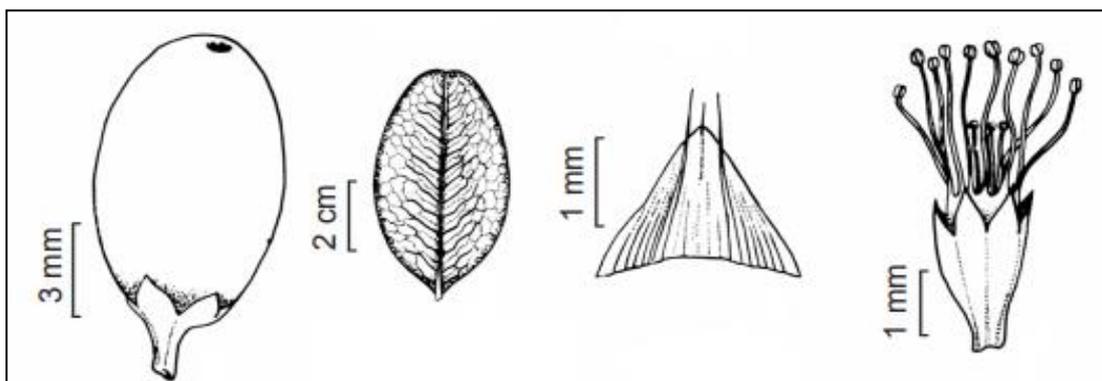


Figura 10: Alguns caracteres morfológicos de *Erythroxylum revolutum*. Da esquerda para a direita: drupa; lâmina foliar; estípula, vista abaxial; flor brevistila, corola removida. Fonte: Adaptada de Costa-Lima et al. 2014.

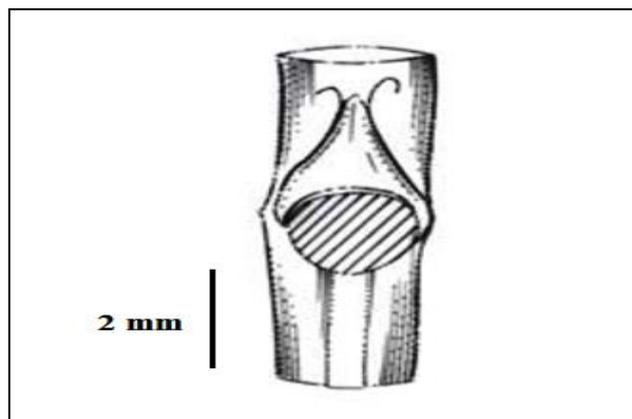
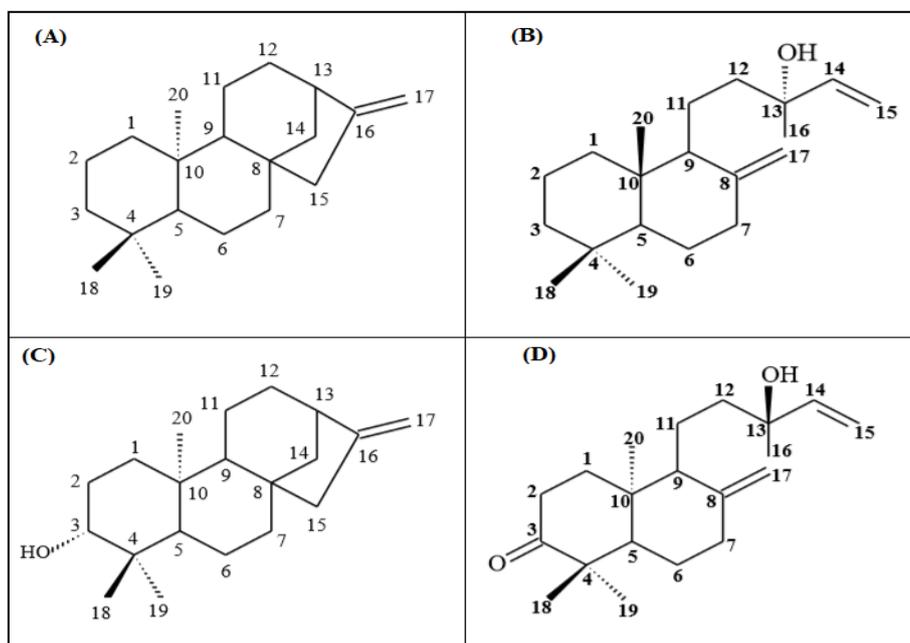


Figura 11: Detalhe da inserção da estípula no pecíolo de *Erythroxylum revolutum* (cicatriz hachurada). Fonte: Adaptada de Loiola et al., 2007.

Ela é utilizada por povos tradicionais como afrodisíaca e para tratar doenças cardiovasculares, procedimento que consiste na decocção em água ou maceração em cachaça de suas folhas e flores (AGRA et al., 2008; LOIOLA et al., 2007). Além disso, nenhum artigo sobre ensaios biológicos com esta espécie foi publicado até o presente momento.

Oliveira (2012) isolou 5 diterpenos a partir da partição líquido/líquido do extrato etanólico bruto (das flohas) de *E. revolutum* com hexano seguida por purificação e isolamento por cromatografia e identificação das estruturas por técnicas de RMN ^{13}C e infravermelho (Figura 12), cujas características físico-químicas encontram-se na Tabela 1. É possível notar na Figura 12, que os compostos A, C e E possuem anéis caurano (tetracíclicos) e os compostos B e D possuem anéis labdano (bicíclicos).



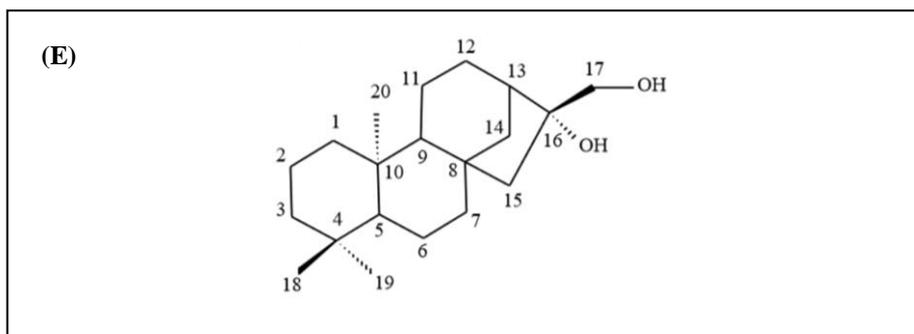


Figura 12: Diterpenos isolados de *Erythroxyllum revolutum*. (A) *ent*-cauran-16-eno. (B) 13-hidroxi-8(17),14-labdadieno. (C) *ent*-cauran-16-en-3 β -ol. (D) *ent*-3-oxo-13-hidroxi-8(17),14-labdadieno. (E) *ent*-cauran-16 β , 17-diol.
Fonte: Adaptada de Oliveira, 2012.

Tabela 1: Características físico-químicas dos diterpenos de *Erythroxyllum revolutum* identificados por Oliveira (2012).

| Composto | Solubilidade e Ponto de Fusão | Aspecto |
|---|-------------------------------|------------------|
| A. <i>ent</i> -cauran-16-eno | Clorofórmio | Óleo incolor |
| B. 13-hidroxi-8(17),14-labdadieno | Clorofórmio | Óleo incolor |
| C. <i>ent</i> -cauran-16-en-3 β -ol | Clorofórmio, PF = 138-140 °C | Pó amorfo branco |
| D. <i>ent</i> -3-oxo-13-hidroxi-8(17),14-labdadieno | Clorofórmio, PF = 238-240 °C | Pó amorfo branco |
| E. <i>ent</i> -cauran-16 β , 17-diol | Clorofórmio, PF = 177-179 °C | Pó amorfo branco |

Dá-se o nome de terpenoide a toda molécula que possui sua origem biossintética no isopreno. Seus esqueletos de carbono são formados pela condensação de unidades pentacarbonadas (unidades isoprênicas) e são classificados de acordo com a quantidade destas unidades. Além disso, eles também podem ser sub-classificados de acordo com o grau de ciclização da molécula, como acíclicos (moléculas abertas), monocíclicos ou bicíclicos (FELIPE e BICAS, 2017).

Os diterpenos são constituídos por quatro unidades isoprênicas e, portanto, possuem 20 carbonos. Eles, juntamente com os triterpenos, estão entre os principais componentes das oleorresinas (secreção de diversos vegetais que possuem óleo essencial e resina). Estas

possuem diversas atividades industriais, como fixadoras de perfume, matéria-prima para a produção de graxas e ceras, entre outras. Um exemplo amplamente conhecido é o Esteviol (Figura 13), um diterpeno na forma de glicosídeo (esteviosídeo), da planta *Stevia rebaudiana*, amplamente utilizado como adoçante natural (FELIPE e BICAS, 2017).

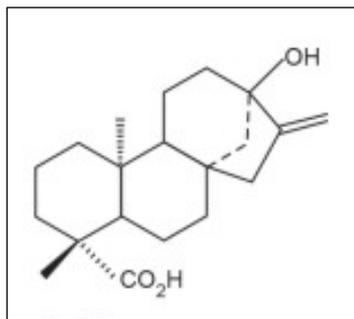


Figura 13: Estrutura molecular do Esteviol. Fonte: <http://globalstevia institute.com>

3. Referências bibliográficas

ABRAHAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v.146, p. 837, 1940.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p. 114-140, 2007.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 472-508, 2008.

AGUIAR, J. S.; ARAÚJO, R. O.; RODRIGUES, M. do D.; SENA, K. X. F. R.; BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P.; OLIVEIRA, S. L.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; NASCIMENTO, S. C.; SILVA, T. G. da. Antimicrobial, Antiproliferative and Proapoptotic Activities of Extract, Fractions and Isolated Compounds from the Stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 4124-4140, 2012.

- ALBUQUERQUE, U. P. et. al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.
- ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p.4168-4170, 2001.
- AZEVEDO, C.M.A. **Bioprospecção**: Coleta de material biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos. Cad. n. 17, 2ed. Revisada, Série Ciência e Pesquisa. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 2003.
- BACCHI, E. A. Alcaloides Tropânicos. In: **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC. Cap. 30. 806p. 2007.
- BALUNAS, M. J. ; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.
- BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. Evolution of antibiotic resistance. **Tree**, v. 12, p. 482-487, 1997.
- BARBOSA, W.L.R.; PINTO, L.N. Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu - sudeste do Pará. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v. 13, p. 47-49, 2003.
- BARREIROS, A. L. B. S.; BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; QUEIROZ, L. P. de. Atividade antioxidante de substâncias presentes em *Dioclea violacea* e *Erythroxylum nummulária*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13 (2), p. 11-13, 2003.
- BARREIROS, M.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.de; DAVID, J.P. Flavonoids and Triterpenes from Leaves of *Erythroxylum nummularia*.**Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p.537-540, 2005.
- BARREIROS et al. Ryanodane diterpenes from two *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1735-1739, 2007.
- BONOMO, R.A.; SZABO, D. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, p.S49-S56, 2006.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, p. 37-39, 2003.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, A. F; SILVA, D. J. H; MOSQUIM, P. R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: **Metabólitos Secundários**. 2 ed. 113 p. Viçosa – MG. 2004.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances A**. Méndez-Vilas (Ed.). 2011.

CHÁVEZ, D.; CUI, B.; CHAI, H.; GARCÍA, R.; MEJÍA, M.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Reversal of Multidrug Resistance by Tropane Alkaloids from the Stems of *Erythroxylum rotundifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 606-610, 2002.

CHIVIAN, E.; BERNSTEIN, A. **Sustaining Life How Human Health Depends on Biodiversity**. New York: Oxford University Press, 2008.

CÓRDOVA, W. H. P.; MATOS, M. G.; TABART, J. SIPEL, A.; KEVERS, C.; DOMMES, J. In vitro characterization of antioxidant properties of Cuban endemic varieties of *Erythroxylum alaternifolium* A. Rich. Isolation of two flavonol glycosides. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 57, p. 1340-1343, 2012.

COSTA-LIMA, J.L.; LOIOLA, M.I.B.; JARDIM, J.G. Erythroxylaceae no Rio Grande do Norte, Brasil. **Rodriguésia**, v.65, p. 659-671, 2014.

DAHLGREN, R.M.T. Rhizophoraceae and Anisophylleaceae: summary statement, relationships. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 75, p.1259-1277, 1988.

DALY, D. Erythroxylaceae. p.143-145. In: SMITH, N. et al. (eds.). Flowering Plants of Neotropics. USA, **The New York Botanical Garden. Princeton University Press**. 2004.

DUARTE M.C.T., FIGUEIRA G.M., SARTORATTO A., REHDER V.L.G., MACHADO A.L.M., DELARMELINA C. Anti-Candida activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

EVANS, W.C. **Trease and evans' pharmacognosy**. London: W. B Saundersp. 14.ed. p. 340-408, 1996.

EWERT, M.; MENDES, R.; RÉDUA, S.; SEOANE, C. E. Vozes da permanência: a conservação ambiental alcançada com o sistema da agrofloresta. p. 393-419. In: STEENBOCK, W.; COSTA e SILVA, L. da; SILVA, R. O. da; RODRIGUES, A. S.; PEREZ-CASSARINO, J. FONINI, R.; SEOANE, C. E.; FROUFE, L. C. M. **Agrofloresta, ecologia e sociedade**. Curitiba: Kairós. 422 p. 2013.

FAIRLEY, H. B. La “anestesia” em el império incaico. **Revista Espanola de Anestesiologia y Reanimacion**, v. 54, p. 556-562, 2007.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química e Sociedade**, v. 39, p. 120-130, 2017.

FRANSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTO, D.D.; GUO, Z.G. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**. v.63, p. 965-981, 1985.

GIORGETTI, M.; ROSSI, L.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the Central Nervous System – a study of historical sources from the 16th to 19th century. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 537-555, 2011.

GONZÁLEZ-GARCÍA, K.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; GONZÁLEZ-GUEVARA, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S. Género *Erythroxylum*: Análisis de la Información Científica. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 24, p. 284-290, 2005.

GONZÁLEZ-GUEVARA, J. L. GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; PINO-RODRÍGUEZ, S.; GARCÍA-TORRES, M.; CARBALLO-GONZÁLEZ, M. T.; EICHEMENDIA-ARANA, O. A.; MOLINA-TORRES, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S. Phytochemical screening and *in vitro* antiherpetic activity of four *Erythroxylum* species. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, p. 506-509, 2004.

GUSMAN, G. S.; CAMPANA, P. R.V.; CASTRO, L.C.; CASTILHO, R.O.; TEIXEIRA, M.M.; BRAGA, F. C. Evaluation of the Effects of Some Brazilian Medicinal Plants on the Production of TNF- α and CCL2 by THP-1 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

HARVEY, A. L.; GERICKE, N. Bioprospecting: Creating a Value for Biodiversity.

Research in Biodiversity - Models and Applications online, p. 323-338, 2011.

INIGO, R.P.A.; POMILIO, A.B. Flavonoids from *Erythroxylon Argentinum*.

Phytochemistry, v. 24, p. 347-349, 1985.

INUI, T.; WANG, Y.; DENG, S.; SMITH, D.C.; FRANZBLAU, S.G.; PAULI, G.F. Counter-current chromatography based analysis of synergy in an anti-tuberculosis ethnobotanical.

Journal of Chromatography A, v.1151, p.211-215, 2007.

JANSEN, A.M.; SCHEFFER, J.J.C.; BAERHEIM, S. A. Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species. **Pharmazie**, v.45, p.70, 1987.

JIRSCHITZKA, J.; SCHMIDTA, G. W.; REICHELTA, M.; SCHNEIDERB, B.;

GERSHENZONA, J.; D'AURIAA, J. C. Plant tropane alkaloid biosynthesis evolved

independently in the Solanaceae and Erythroxylaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. 10304-10309, 2012.

LEYVA, O.; ALONSO, A.; ROSARIO, L. A.; DÍAZ, A.; PRADO, Y.; RODEIRO, I.;

ARENCIBIA, D. F. Evaluación antigenotóxica del extracto etanólico de *Erythroxylum minutifolium* grises utilizando el ensaio SOS. **Revista de Toxicologia em Linha**, p. 36-48, 2003.

LOHEZIC, F.; AMOROS, M.; BOUSTIE, J.; GIRRE, L. In-vitro Antiherpetic Activity of *Erythroxylon laurifolium* (Erythroxylaceae). **Pharmacy and Pharmacology**

Communications, v. 5, p. 249-253, 1999.

LOIOLA, M. I. B.; AGRA, M.de F.; BARACHO, G. S.; QUEIROZ, R. T. de. Flora da

Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 473-487, 2007.

LUCAS-FILHO, M. D. Estudo fitoquímico de espécies do gênero *Erythroxylum* com potencial atividade vasodilatadora e inibidora da enzima conversora de angiotensina. 118p.

Dissertação – Universidade Federal de Ouro Preto. 2009.

MAIA, A. K. H. L.; QUEIROZ, R. B. de; FONSÊCA, D. V. da; PINHO, A. S.; SANTOS, S.

G. dos; ALENCAR, J. L. de; TAVARES, J. F.; ALMEIDA, R. N. de; MORAIS, L. C. S. L. de. Antinoceptive activity of the extract of *Erythroxylum caatingae*. **Boletín**

Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, v. 13, p. 152-162, 2014.

MANN, J. (Org). **Secondary Metabolism**. 2ed. Oxford: Clarendon Press, 1987.

MARQUES, E. M.; RANIERI, V. E. L. Determinantes da decisão de manter área protegidas em terra privadas: O caso das reservas legais do estado de São Paulo. **Ambiente e Sociedade**, 2012.

MARTÍNEZ M.J.; BETANCOURT J.; ALONSO-GONZÁLEZ N.; JAUREGUI A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.52, p. 171-174, 1996.

MATSUURA, H. N.; FETT-NETO, A. G. Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. **Plant Toxins**, p. 1-15, 2015.

MEDEIROS, P. M. de; LADIO, A. H.; SANTOS, M. M.; ALBUQUERQUE, U. P. Does the selection of medicinal plants by Brazilian local populations suffer taxonomic influence? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 842-852, 2013.

MI, Q.; CUI, B.; SILVA, G. L.; LANTVIT, D.; LIM, E.; CHAI, H.; HOLLINGSHEAD, M. G.; MAYO, J. G.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M. Pervilleines B and C, new tropane alkaloid aromatic esters that reverse the multidrug-resistance in the hollow fiber assay. **Cancer Letters**, v. 184, p.13-20, 2002.

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Caatinga. Link:
<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>. Acesso em: fev/2018.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

NAVARRO, V.; VILLARREAL, M.L.; ROJAS, G.,; XAVIERB L. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases, **Journal of Ethnopharmacology**, v.53, p. 143-147, 1996.

ODDS, F. C.; BROWN, A.J.P.; GOW, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v.11, p. 272-279, 2003.

OLIVEIRA, S. L. de. Fitoquímica de espécies de *Erythroxylum* do semiárido: isolamento e determinação estrutural de alcaloides tropânicos, flavonoides e diterpenos. **Tese** - Universidade Federal da Paraíba. 192p. 2012.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.

PLOWMAN, T.C. Erythroxylaceae Kunth. In: STEVENS, W.D.; ULLOA, C.; POOL, A.; MONTIEL, O.M. (eds.). Flora de Nicaragua. **Monographs Systematic Botany Missouri Botanical Garden**, v.85, p.834-838, 2001.

PUENTES, J. P.; HURRELL, J. A. Plantas andinas y sus productos comercializados com fines medicinales y alimentarios em el Área Metropolitana Buenos Aires-La Plata, Argentina. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14, n. 3, p. 206-236, 2015.

QUEIROZ, L. P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A. M. (Org.). **Towards Greater Knowledge of the Brazilian Semi-arid Biodiversity**. Brasília: MCT/SPPPD. 140 p. 2006.

RAMAWAT, K. G.; DASS, S.; MATHUR, M. The Chemical Diversity of Bioactive Molecules and Therapeutic Potencial of Medicinal Plants. In: RAMAWAT, K. G. (ed.). **Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine**, Berlin: Springer-Verlag, p. 7-32, 2009.

RASOANAIVO, P.; RAKOTONANDRASANA, O. L.; RAMANITRAHASIMBOLA, D.; RATSIMAMANGA, S. Traditional medicine and resistance modulators. **Ethnopharmacologie**, n. 35, p.33-38, 2005.

REIS, M. R.; ALBUQUERQUE, J. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, D. F. Efeito vasodilatador do extrato metanólico de *Erythroxylum caatingae* Plowman sobre anéis mesentéricos de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 11, p.123-128, 2012.

RENNER, U.D.; OERTEL, R.; KIRCH, W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical use of scopolamine. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.27, p. 655–665, 2005.

RYLANDS, A. B.; BRANDON, K. Unidades de conservação brasileiras. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, 2005.

SANTILLI, J. F. R. **Agrobiodiversidade e direito dos agricultores**. São Paulo: Peirópolis, 1ed. 43 p. 2009.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 403-434, 2007.

SCHWARZBACH, A. E.; RICKLEFS, R. E. Systematic affinities of Rhizophoraceae and Anisophylleaceae, and intergeneric relationships within Rhizophoraceae, based on chloroplast DNA, nuclear ribosomal DNA, and Morphology. **American Journal of Botany**, v. 87, p. 547-564, 2000.

SILVA, G. L.; CUI, B.; CHÁVEZ, D.; YOU, M.; CHAI, H.; RASOANAIVO, P.; LYNN, S. M.; O'NEILL, M.; LEWIS, J. A.; BESTERMAN, J. M.; MONKS, A.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; KIGHORN, A. D. Modulation of the Multidrug-Resistance Phenotype by New Tropane Alkaloid Aromatic Esters from *Erythroxylum pervillei*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1514-1520, 2001.

SILVA, A. F.; RABELO, M. F. R.; ENOQUE, M. M. Diversidade de angiospermas e espécies medicinais de uma área de Cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n.4, p.1016-1030, 2015.

SOOBATTE, M. A.; BAHORUN, T.; NEERGHEEN, V. S.; GOOGOLYE, K.; ARUOMA, O. I. Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 45-56, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Art Med. 3 ed. 719 p. 2004.

TAKAHASHI, R. N.; CALIXTO, J. B.; COSTA, I. M.; LIMA, T. C. M.; MORATO, G. S.; NICOLAU, M.; ERA, G. A.; VALLE, R. M. R.; YUNES, R. A. Análise química e perfil farmacológico do *Erythroxylum argentinum*. **Acta Amazonica**, v. 18, p. 407-424, 1988.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VILLANUEVA, V. A.; NAKATA, H. M. Plantas medicinales: Efecto antibacteriano *in vitro* de *Plantago major* L, *Erythroxylum novogranatense*, *Plowman var truxillense* y *Camellia sinensis* sobre bacterias de importancia estomatológica. **Odontologia Sanmarquia**, v. 13, p. 21-25, 2010.

VIOLANTE, I. M. P.; HAMERSKI, L.; GARCEZ, W. S.; BATISTA, A. L.; CHANG, M. R.; POTT, V. J.; GARCEZ, F. R. Antimicrobial Activity of some Medicinal Plants from the Cerrado of the central-western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p.1302-1308, 2012.

WET, H. de. Antibacterial activity of the five South African *Erythroxylaceae* species. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 11511-11514, 2011.

WHO (World Health Organization). **Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance**.256p. 2014.

4- Artigos científicos

4.1 - Artigo científico I

Artigo científico a ser encaminhado a Revista **Journal of Ethnopharmacology**.

Todas as normas de redação e citação, doravante, atendem as estabelecidas pela referida revista, exceto o idioma.

Uso tradicional, Fitoquímica e Farmacologia do gênero *Erythroxylum*: Uma Revisão Sistemática com enfoque na Conservação da Biodiversidade Molecular.

Maísa F. S. Barbosa^a; Paulo H. O. Miranda; Carlos A. Souza; Irwin R. A. Menezes; Henrique D. M. Coutinho; Rogério A. Saraiva^{b*}

a UFRPE (Universidade Federal Rural de Pernambuco).

b URCA (Universidade Regional do Cariri).

Resumo

A etnofarmacologia tem demonstrado ser uma ciência bastante eficaz na descoberta de novas substâncias terapêuticas. Este artigo consiste numa revisão sistemática sobre o potencial do gênero *Erythroxylum* P. Browne para a terapêutica moderna, visto que as últimas já se encontram ultrapassadas. Descrevemos alguns usos na medicina de povos tradicionais, os metabólitos secundários cujas estruturas já foram elucidadas e as atividades farmacológicas investigadas nos últimos anos, fornecendo boas pistas para os pesquisadores em produtos naturais que buscam moléculas bioativas pelo critério da quimiosistemática. Ao mesmo tempo alertamos sobre a necessidade do uso sustentável deste recurso através de argumentos ecológico-evolutivos.

Palavras-chave: Etnofarmacologia, metabólitos bioativos, quimiosistemática.

1. Introdução

Investigar a medicina dos povos tradicionais é importante porque possibilita a descoberta de novas substâncias com potencial terapêutico e fornece informações importantes sobre sua eficácia e efeitos colaterais. A etnofarmacologia tem um papel fundamental nesse processo de descoberta, pois pode inclusive alertar as populações sobre possíveis efeitos tóxicos. É importante ressaltar que os produtos extraídos das plantas medicinais não fornecem apenas moléculas benéficas à saúde, mas também podem ter efeitos tóxicos ou se transformar em um composto tóxico dentro do organismo que o ingere (Zhao, 2014). A maioria dos fitoterápicos não possui certificação pelas agências reguladoras de saúde e são vendidos livremente no comércio informal sem nenhuma informação sobre possíveis efeitos adversos (Neto, 2013; Puentes e Hurrell, 2015).

O gênero *Erythroxylum* P. Browne possui distribuição pantropical, sendo mais abundante na bacia Amazônica da América do Sul, nos Andes e em Madagascar (Daly, 2004). Tornou-se amplamente conhecido devido à cocaína, alcaloide extraído de *Erythroxylum coca*, mas o seu potencial bioativo vai bem mais além. As espécies deste *taxa* possuem uma variedade de alcaloides tropânicos que se destacaram como candidatos a fármacos (Cordell, 2011). Muitos estudos demonstram o potencial bioativo destas moléculas, assim como também de terpenoides e flavonoides provindos do gênero (González-García et al., 2005).

A cocaína é o exemplo mais conhecido de alcaloide extraído de *Erythroxylum coca*, planta utilizada como terapêutica na medicina popular (e durante muito tempo na clássica também). Ela se transformou em um sério problema de saúde pública, pois causa dependência química devido a sua ação simpaticomimética indireta, bloqueia o transportador pré-sináptico de dopamina, aumentando os níveis de dopamina, serotonina e noradrenalina, intimamente relacionadas com o mecanismo de recompensa e adição (Uríguen e Callado, 2010). Obviamente, estes efeitos só foram descobertos após a sua ampla utilização. Este evento é um dos muitos que serviram de alerta para toda a comunidade da farmacologia, que passou a ter uma maior preocupação com os efeitos toxicológicos das plantas utilizadas.

Durante muito tempo a indústria farmacêutica explorou a diversidade de moléculas fornecidas pelos organismos vivos, mas apenas em 2003 ela foi apresentada para a comunidade científica como a quarta fonte de biodiversidade, a biodiversidade molecular, que pode ser definida como a riqueza de moléculas encontrada na vida. Os eventos de especiações e de extinções, inclusive, estão diretamente relacionados com a diversidade molecular, quanto

maior é esta diversidade, maior a probabilidade da espécie se adaptar a um ambiente em constantes mudanças e, quanto menor essa diversidade, maiores são as chances de extinção (Campbell, 1994). Conhecer essa diversidade é o elemento chave para a implantação de estratégias de uso sustentável desse recurso, não apenas no que diz respeito às moléculas de interesse para a indústria farmacêutica, mas para toda e qualquer atividade que faça uso das biomoléculas, visto que elas são fundamentais para a sobrevivência e evolução das espécies, filios e ecossistemas (Campbell, 2003).

O presente artigo destaca o potencial terapêutico deste gênero e a diversidade de metabólitos secundários encontrados. O intuito é contribuir para as pesquisas em farmacologia de produtos naturais e ressaltar a importância da integração da Etnofarmacologia e da Conservação da Biodiversidade para atingir um mercado farmacêutico sustentável.

2. Metodologia

O presente estudo consistiu em uma pesquisa exploratória nas plataformas “Web of Science”, PubChem”, “PubMed” e “Scholar Google”. Foi realizado um levantamento dos artigos sobre o potencial terapêutico dos produtos extraídos das espécies deste gênero (conhecimento empírico e popular), bem como dos metabólitos secundários que as compõem. Após este levantamento, foi realizada a triagem dos artigos, onde foram escolhidas as publicações mais recentes e relevantes a este estudo e, por fim, a compilação dos resultados.

3. Resultados e Discussão

3.1 Etnofarmacologia

Na Tabela 1 estão listadas as espécies utilizadas atualmente na medicina tradicional e os seus respectivos usos.

Tabela 1: Usos populares de *Erythroxylum* para fins medicinais.

| Espécie | Localidade | Parte da Planta | Modo de preparo | Uso Medicinal | Referência |
|--|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|-----------------------------|
| <i>Erythroxylum campestre</i> A.St.-Hil. | Cerrado do Brasil | Raiz e casca. | - | Purgante e estimulante. | Corrêa, 1984 Silva, 2015 |

| | | | | | |
|---|---------------------------------|--|-----|--|--------------------------------------|
| <i>Erythroxylum coca</i> Lam. var. <i>coca</i> | Argentina | Folhas | - | Estimulante, antianêmico, antiinflamatório, contra problemas respiratórios, circulatórios, gastrointestinais, hepáticos, dores de cabeça e garganta e para problemas na pele. | Puentes e Hurrell, 2015. |
| | Chicago, Costa Rica e Colômbia. | - | - | Anestésico para dores de dente. | Colvard (2006) |
| | Iquique (Peru) | - | - | Anestésico para dor de estômago e de cabeça, utilizada também para doença de altitude, estresse e para regular a pressão arterial. | Madaleno e Delatorre-Herrera, (2013) |
| | Amazônia (Peru) | - | - | Fortificante, anestésico local, antianêmico, antiespasmódico, calmante, cólicas estomacais, contra fadiga, gastrite, amigdalite, e reconstituente dos sistemas nervoso, arterial e da mente. | Salgado (2007) |
| <i>Erythroxylum coca</i> Lam. var. <i>Ipadu</i> | Índios Krahô no Brasil | - | - | Usada como antidepressivo e/ou estimulante. | Rodrigues e Carlini (2006) |
| <i>Erythroxylum havanense</i> | Província Camaguei (Cuba) | Raíz | - | Antianêmico. | Beyra et al. (2004) |
| <i>Erythroxylum macrocarpum</i> | Maurício (África) | - | - | Utilizada para distúrbios renais. | Al-Said et al. (1986) |
| <i>Erythroxylum macrophyllum</i> | Índios Kayapós (Brasil) | - | - | Usada em queimaduras de "poraquê". | Barbosa e Pinto (2003) |
| | Oriente de Cuba | Raíz em sinergismo com a raíz <i>Senna</i> | Chá | Anestésico para dores musculares. | Cano e Volpato (2004) |

| | | | | | |
|--|---------------------------------|----------------------|-------------------------------|---|---|
| | | <i>occidentalis.</i> | | | |
| <i>Erythroxylum moonii</i> | Siri Lanka | - | - | Anti-helmintico e para supurar abscessos e furúnculos. | Khattak et al. (2002) |
| <i>Erythroxylum monogynum</i> Roxb. | Nilgiris (Índia) | Folha | - | Utilizada para doenças de pele. | Venkatachalapathi et al. (2015) |
| | Tiruchirappalli (Índia) | Folha | - | Para Icterícia. | Nandagoapalan et al. (2015) |
| | Maruhamalai (Índia) | Folha | - | Diurético sudorífico e para o estômago. | Senthilkumar et al. (2006) |
| <i>Erythroxylum novagrana-tense</i> | Chicago, Costa Rica e Colômbia. | - | - | Indicada como anestésico para dores de dente. | Colvard et al. (2006) |
| <i>Erythroxylum pervillei</i> | Madagascar | Casca | Uso tópico do pó. | É usado contra inflamações, tumores, doenças fúngicas na pele, acne e furúnculos. | Rasoanaivo, (2005) |
| <i>Erythroxylum pungens</i> O. E. Schulz | Nordeste do Brasil. | Casca do caule | Maceração em água ou cachaça. | Consumida antes das refeições como afrodisíaco. | Agra et al. (2008) |
| <i>Erythroxylum revolutum</i> Mart. | Nordeste do Brasil. | Folhas e flores. | Decocto ou cachaça. | Para hipertensão, problemas cardíacos e como afrodisíaco. | Albuquerque et al. (2007); Agra et al. (2008) |
| <i>Erythroxylum sideroxyloides</i> | Maurício (África) | - | - | Utilizada para distúrbios renais. | Al-Said et al., 1986) |
| <i>Erythroxylum suberosum</i> A.St.-Hil. | Cerrado do Brasil. | - | - | Fortificante. | Guarim-Neto (2009); Silva (2015). |
| | Índios Kayapós (Brasil) | - | - | Anestésico, agente antirreumático e contra a má digestão. | Barbosa e Pinto (2003) |
| <i>Erythroxylum subracemosum</i> | Índios Kayapós (Brasil) | - | - | Indicada para doenças respiratórias | Barbosa e Pinto (2003) |

| | | | | | |
|-------------------------------------|---------------------------|------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------|
| <i>Erythroxylum rotundifolium</i> | Província Camaguei (Cuba) | Folhas e brotos. | - | Para a prevenção de catarata. | Beyra et al. (2004) |
| <i>Erythroxylum tortuosum</i> Mart. | Cerrado do Brasil. | Raíz do caule | - | Laxante Anti-hemorrágico | Silva (2015) |
| <i>Erythroxylum vacciniifolium</i> | Nordeste do Brasil. | Casca | Chá ou cachaça. | Estimulante | Zanollari et al. (2003) |
| <i>Erythroxylum zeylanicum</i> | - | Folhas | - | Anti-helmíntico | Bringmann (2000) |

O uso mais antigo de que se tem conhecimento data do Império Inca, onde *Erythroxylum coca* L. var *coca* era utilizada como anestésico e como estimulante (Fairley, 2007). Documentos etnobotânicos do Brasil do século XIX relatam que a medicina popular já tinha algumas noções da sua ação no sistema nervoso central e conhecimento sobre os efeitos viciantes desta planta (Giorgetti, 2011).

Povos de diferentes culturas produziram de forma independente conhecimento acerca das propriedades biológicas de espécies deste *taxon* e as utilizam até os dias atuais para as mais diversas finalidades, como anestésica, anti-inflamatória, antidepressiva, antifúngica, anti-helmíntica, etc. Estes resultados demonstram o potencial bioativo deste gênero.

3.2. Biodiversidade Molecular

Embora o termo biodiversidade seja comumente utilizado para designar o número e as abundâncias relativas das espécies, ela existe em quatro modos: a de espécies, a de genes, a de habitats e a molecular. Esta última é o resultado de duas forças agindo em direções opostas, a diversificação de estruturas químicas e a seleção natural. Esta diversidade promove as diferenças nas características dos indivíduos sobre as quais a seleção natural atua. Ela ocorre em diferentes níveis de organização, dentro do indivíduo e entre indivíduos de uma mesma espécie, entre espécies relacionadas, dentro e entre filós, entre ecossistemas e ao longo da evolução (Campbell, 2003; Berkov, 2014).

A superexploração das plantas medicinais, resultado do uso descontrolado dos recursos naturais, é um dos principais agentes causadores da perda de biodiversidade, logo, estratégias inovadoras tornaram-se uma necessidade para a comunidade das ciências dos produtos naturais e da etnofarmacologia, exigindo dos pesquisadores, além do envolvimento na política de saúde pública, o uso socialmente responsável de suas fontes (Cordell e Colvard, 2007).

Vamos considerar neste estudo apenas as moléculas provenientes do metabolismo secundário do gênero porque elas têm recebido uma maior atenção da indústria farmacêutica na descoberta de novas entidades químicas, embora saibamos que a biodiversidade molecular não está restrita apenas a estes metabólitos.

Um dado peculiar é o do estudo de Cazaña-Martinez (2003), ele observou que nas três espécies de *Erythroxylum* que investigou a maioria dos metabólitos secundários presentes nas folhas foram identificados nos extratos polares (frações etanólica e aquosa).

A maioria dos estudos utilizaram a casca do caule e as folhas, mas alguns trabalhos com a raiz também foram feitos. As folhas apresentaram uma maior diversidade molecular quando comparada com outras partes da planta, com exceção de *E. zeylanicum*, que apresentou uma maior diversidade na raiz. A grande maioria dos estudos são focados nos alcaloides tropânicos, provavelmente devido ao potencial farmacêutico desta classe. Também foram isolados flavonoides, flavonóis e cinchonaínas, mas os estudos sobre estas classes ainda são uma minoria no gênero (Tabela 2).

Tabela 2: Metabólitos secundários isolados e caracterizados em espécies de *Erythroxylum*.

| Espécie | Parte da Planta | Moléculas Caracterizadas | Referência |
|--|-----------------|---|-------------------------|
| <i>Erythroxylum alaternifolium</i> | Folhas | 1 alcalóide tropânico: Alaternifolina (3 α ,7 β -dibenzoiloxi,6 β -hidroxi-tropano). | Payo-Hill et al. (2000) |
| | Folhas | Quantificação de miricetina, campferol e quercetina e elucidação estrutural de dois flavonoides glicosilados: Ombuina-3-O-rutinosídeo e quercetina-3-O-rutinosídeo. | Córdova et al. (2012) |
| <i>Erythroxylum argentinum</i> Schulz | Folhas | 4 alcalóides: 1. Acido hidroxifengrínico; 2. Tropacocaina; 3. Metilecgonidina; 4. 3 β ,6 β -ditigloiloxinortropano. | Zuanazzi et al. (2001) |
| <i>Erythroxylum betulaceum</i> | Caule | 4 moléculas: 1. Vanilina; 2. 3-oxo(-)-maool; 3. 3 β -hidroxi(-)-manool; 4. ent-2 β ,19-diidroxi-beyer-15-en-1-ona. | Ribeiro (2011) |

| | | | |
|--|----------------|---|--|
| <i>Erythroxylum caatingae</i> Plowman | Casca do caule | 4 alcalóides tropânicos : 1. 3 α ,6 β dibenzoiloxitropano; 2. Catuabina B (3 α -(3',4',5'-trimetoxibenzoico)-6 β -benzoxitropano); 3. 3 α -(3',4'-dimetoxi)-6 β -hidroxitropano; 4. 3 α -(<i>trans</i> -3',4',5'-trimetoxicinamoico)-6 β -benzoiloxitropano. | Oliveira (2012) |
| <i>Erythroxylum confusum</i> Britton | Folhas | 1 ácido graxo esterificado com triterpeno: palmitato de β -amirina. | Álvarez-Reyes et al. (2008) |
| <i>Erythroxylum cuneifolium</i> (Martius) Schulz | Folhas | 1 alcalóide: Metilecgonidina. | Zuanazzi et al. (2001) |
| <i>Erythroxylum deciduum</i> Saint-Hilaire | Folhas | 1 alcalóide: Metilecgonidina. 1 triterpeno: estearato de β -amirina 1 ácido graxo ligado a β -amirina: hexadecanoato de β -amirina. | Zuanazzi et al. (2001) Paula (2012) |
| <i>Erythroxylum ellipticum</i> | Caule | 1 alcalóide: 3,4,5-trimetoxicinamato-tropina. | Johns et al. (1970) |
| <i>Erythroxylum emarginatum</i> | Casca do Caule | 2 alcalóides tropânicos: 1. éster metílico de anidroecgonina; 2. <i>N</i> -óxido de éster metílico de anidroecgonina. | Nishiyama et al. (2007) |
| <i>Erythroxylum gonocladum</i> | Folhas | 1 flavonóide: diidroquercetina-3-O-alfaramnosídeo (astilbina) 1 fitoesteróide: beta-sitosterol. Uma mistura de ácidos palmítico, esteárico e linolênico. | Filho (2009) |
| <i>Erythroxylum hypericifolium</i> | Carca do caule | 13 alcalóides: 1. 3 α -Fenilacetoxinortropan-6 β -ol; 2. 6 β -Acetoxi-3 α -benzoiloxitropano; 3. 3-Acetoxi-6-fenilacetoxitropano; 4. 3 α -Fenilacetoxitropano; 5. 3 α -Fenilacetoxitropano-6 β -ol; 6. 6 β -Acetoxi-3 α -fenilacetoxitropano; 7. 3 α -Fenilacetoxitropano-6 β ,7 β -diol; 8. 3 α -(3-Hidroxifenilacetoxi)-tropano; 9. 3 α -Benzoiloxinortropano; 10. 3-Benzoiloxitropano-6-ol; 11. 3 α -trimetoxicinamoicotropano; 12. Higrina (principal base); 13. Cuscoigrina. | Al-Said et al. (1989) |
| <i>Erythroxylum</i> | Folhas | 5 alcalóides: | Al-Said et al. |

| | | | |
|--|----------------|--|----------------------------|
| <i>macrocarpum</i> | | <ol style="list-style-type: none"> 1. 3α-Benzoiloxinortropano; 2. tropan-3β-ol; 3. tropacocaina; 4. 3α-benzoiloxinortropan-6β-ol; 5. ester de tropan-3-ol não-definido. | (1986) |
| | Casca do caule | 1 alcalóide: 3 α -Benzoiloxinortropano. | |
| | Casca da raíz | 1 alcalóide: 3 α -Benzoiloxinortropano. | |
| <i>Erythroxylum macrophyllum</i> Kunth | Folhas | <p>7 moléculas:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Acido neoclorogênico; 2. Acido protocatequico; 3. Quercetina-7-<i>O</i>-α-ramnopiranosideo; 4. 5-<i>O</i>-β-glucopiranosilombuina-3-<i>O</i>-β-rutinosideo; 5. Rutina; 6. Quercetina; 7. Ombuina-3-<i>O</i>-β-rutinosideo. | Guldbrandsen et al. (2015) |
| <i>Erythroxylum microphyllum</i> Saint-Hilaire | Folhas | <p>2 alcalóides:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tropacocaina; 2. Metilecgonidina. | Zuanazzi et al. (2001) |
| <i>Erythroxylum moonii</i> | Folhas | <p>4 alcalóides tropânicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 3α-isobutiriloxi-7β-hidroxinortropano; 2. 3α-hidroxi-7β-fenilacetoxinortropano; 3. 3α-<i>cis</i>-cinamoicoxitropano; 4. 3α-hidroxi-6β-(3'-hidroxi-2-metil-3'-fenilpropionicoxi)-7β-hidroxitropano. | Khattak et. al. (2002) |
| <i>Erythroxylum numulária</i> Peyer | Folhas | <p>3 moléculas:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 4',7-dimetil-3',5-diidroxiflavanol; 2. Quercetina (3',4',5,7-tetrahidroxiflavanol); 3. Epicatequina. | Barreiros et al. (2003) |
| <i>Erythroxylum pelleterianum</i> Saint-Hilaire | Folhas | <p>2 alcaloides:</p> <ol style="list-style-type: none"> 3. Tropacocaina; 4. Metilecgonidina. | Zuanazzi et al. (2001) |
| <i>Erythroxylum pervillei</i> | Raízes | <p>9 esteres aromáticos de alcaloides tropânicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 3-fenilacetato de tropan-3α,6β,7β-triol; 2. 1αH,5αH-tropan-3α-il 3,4,5-trimetoxibenzoato; 3. Pervilleina A (3α-(3,4,5-trimetoxicinamoico)-7β-hidroxitropano); 4. <i>N</i>-oxido de Pervilleina A ou <i>N</i>-oxido-3α-(3,4,5-trimetoxicinamoico)-7β-hidroxitropano; 5. Pervilleina B ou 3α-(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)-6β-(<i>E</i>)-(3,4,5-trimetoxicinamoico)-tropano); 6. Pervilleina C ou 3α,6β-di-((<i>E</i>)-3,4,5-trimetoxicinamoico)tropano; | Silva et al. (2001) |

| | | | |
|---|----------------|---|---------------------------|
| | | <ol style="list-style-type: none"> 7. Pervilleina D ou 3α,6β-di-((<i>E</i>)-(3,4,5-trimetoxicinnamoico)-7β-hidroxitropano)); 8. Pervilleina E ou 3α-(3-hidroxifenilacetoxi)-6β-(<i>E</i>)-(3,4,5-trimetoxicinnamoico)tropano; 9. Pervilleina F ou 3α-fenilacetoxi-6β-(<i>E</i>)-(3,4,5-trimetoxicinnamoico)-tropano. | |
| | Casca do caule | <p>4 ésteres aromáticos de alcaloides tropânicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pervilleina G ou 3α-(<i>E</i>)-(3,4,5-trimetoxicinnamoico)-6β-hidroxitropano); 2. Pervilleine H ou 3α-(<i>E</i>)-(3,4,5-trimetoxicinnamoico)-6β,7β-dihidroxitropano; 3. <i>cis</i>-pervilleina B ou 3α-(3,4,5-trimetoxibenzeno)-6β-(<i>Z</i>)-(3,4,5-trimetoxicinnamoico)-tropano; 4. <i>cis</i>-pervilleina F ou 3α-fenilacetoxi-6β-(<i>Z</i>)-(3,4,5-trimetoxicinnamoico)-tropano. | Chin et. al. (2006) |
| <i>Erythroxylum pulchrum</i> A. St.-Hil | Folhas | <p>3 flavonóides glicosilados:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Quercetina-3-<i>O</i>-α-<i>L</i>-ramnosídeo; 2. Ombuina-3-rutinosídeo (4',7-di-<i>O</i>-metilquercetina-3-<i>O</i>-β-rutinosídeo); 3. Ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo (4',7-di-<i>O</i>-metilquercetina-3-<i>O</i>-β-glicosídeo). | Albuquerque et al. (2014) |
| <i>Erythroxylum revolutum</i> Mart | Folhas | <p>6 diterpenos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>ent</i>-kauran-16-eno; 2. 13-hidroxi-8(17),14-labdadieno; 3. <i>ent</i>-caur-16-en-3β-ol; 4. 3-oxo-13-hidroxi-8(17),14-labdadieno; 5. 3,13,19-trihidroxi-8(17),14-labdadieno; 6. <i>ent</i>-kauran-16β,17-diol. | Oliveira (2012) |
| <i>Erythroxylum rimosum</i> | Folhas | <p>1 alcalóide tropânico: 2β-acetoxi-3β,6α-dibenzoiloxitropano. 2 ésteres de α-amirina e β-amirina. 1 fitoesteróide: β-sitosterol. 10 flavonoides:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Quercetina; 2. Campferol; 3. 3-<i>O</i>-α-<i>L</i>-arabinofuranosídeo; 4. Catequina; 5. Epicatequina; 6. Quercetina-3-<i>O</i>-α-arabinofuranosídeo; 7. Quercetina-3-<i>O</i>-α-arabinopiranosídeo; 8. Quercetina-3-<i>O</i>-β-arabinopiranosídeo; | Ribeiro (2011) |

| | | | |
|--|---------------------------------|--|--------------------------|
| | | 9. Quercetina-3 β -glucopiranosídeo; 10. Quercetina-3 β -galactopiranosídeo. | |
| <i>Erythroxylum rotundifolium</i> | Folhas e Caule | 1 alcalóide tropânico: Eritrorotundina ou 3 α -(3,4,5-trimetoxi-cinnamoico)-7 β -(3,4,5-trimetoxibenzeno)-6 α -hidroxi-tropano. | Payo-Hill et al. (2000) |
| <i>Erythroxylum sideroxyloides</i> | Folhas | 4 alcalóides tropânicos: 1. 3 α -Benzoicoxinortropan-6 β -ol; 2. 3 α -benzoicoxitropan-6 β -ol; 3. 3 α -benzoicoxinortropano; 4. 3 α -benzoicoxitropano. Também foi isolada uma base indefinida. | Al-Said e Grout (1986) |
| | Casca do caule Casca da raíz | 1 alcalóide: 3 α -Benzoiloxinortropano. 1 alcalóide: 3 α -Benzoiloxinortropano. Também foi isolada uma mistura não-conhecida de ésteres de diol envolvendo ácidos butíricos e outros. | |
| <i>Erythroxylum suberosum</i> | Folhas | 4 flavonoides: 1. Quercetina; 2. Hiperina (3-O- β -D-galactopinanosil); 3. Isoquercitrina (quercetina-3-O- β -D-glucopiranosídeo); 4. Ombuina-3-rutinosídeo (7,4'-di-O-metilquercetina-3-O- β -rutinosídeo). | Nascimento (2014) |
| | Raízes | 2 alcaloides tropânicos: 1. Tropacocaina; 2. Nortropacocaina. 2 flavonoides: 1. Catequina; 2. Epicatequina. 3 esteroides: 1. Campesterol; 2. Estigmasterol; 3. β -sitosterol. | Nascimento (2014) |
| <i>Erythroxylum subrotundum</i> A. St.-Hil | Folhas | 2 flavonoides: 1. Quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo; 2. 5,7,4'-trihidroxi-flavona-3-O- α -L-ramnosídeo. | Oliveira (2012) |
| <i>Erythroxylum vacciniifolium</i> | Casca do caule | 8 alcalóides tropânicos: 1. Catuabina B ou 3 α -(1-metil-1H-pirrol-2- carboxílico)-6 β -(1H-pirrol-2- carboxílico)-tropano; 2. 7 β -hidroxicatuabina D ou 3 α -(1-metil-1H-pirrol-2- carboxílico)-6 β -(1H-pirrol-2- carboxílico)-7 β -hidroxitropano; 3. Catuabina E ou 3 α -6 β -di(1-metil-1H-pirrol-2- carboxílico)tropano; 4. 7 β -hidroxicatuabina E ou 3 α ,6 β -di(1-metil-1H-pirrol-2- carboxílico)-7 β - | Zanolari et al. (2003)-a |

| | | |
|----------------|--|--------------------------|
| | <p>hidroxitropano;</p> <ol style="list-style-type: none"> 5. 7β-acetilcatuabina E ou 7β-acetoxi-3α-6β-di(1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-carboxílico)-tropano; 6. Catuabina F ou 3α-(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico)-6β-(1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-carboxílico)-tropano; 7. 7β-hidroxycatuabina F ou 3α-(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico)-6β-(1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-carboxílico)-7β-hidroxitropano; 8. Catuabina G ou 3α-(3-hidroxifenilacetoxi)-6β,7β-dihidroxitropano. | |
| Casca do Caule | <p>6 alcalóides tropânicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Catuabina D ou 3α-(1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-carboxílico)-6β-(1<i>H</i>-pirrol-2-carboxílico)-tropano; 2. 3α-6β-di(1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-carboxílico)-7β-hidroxitropano; 3. 3α,6β-di(1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-carboxílico)-tropano; 4. 7β-acetoxi-3α-6β-di(1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-carboxílico)-tropano; 5. 3α,7β-dihidroxi-6β-(1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-carboxílico)-tropano; 6. 3α-hidroxi-6β-(1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-carboxílico)-tropano. <p>+18 alcalóides parcialmente identificados tendo o mesmo esqueleto de tropano esterificado nas posições 3 e 6 por ácido 1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-carboxílico e/ou ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico.</p> | Zanolari et al. (2003)-b |
| Cascas | <p>9 alcaloides tropânicos de metilpirrol:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Catuabina H ou 3α-hidroxi-6β-((1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-il)-carboxílico)-tropano; 2. Isocatuabina H ou 3β-hidroxi-6β-((1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-il)-carboxílico) tropano; 3. 7β-hidroxycatuabina H ou 3α,7β-dihidroxi-6β-((1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-il) carboxílico)-tropano; 4. 7α-hidroxycatuabina H ou 3α,7α-dihidroxi-6β-((1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-il) carboxílico)-tropano; 5. Catuabina I ou 6β-hidroxi-3α-((1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-il)-carboxílico)-tropano; 6. 7β-hidroxycatuabina I ou 6β,7β-dihidroxi-3α-((1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-il)-carboniloxi)-tropano; 7. Vacinina A ou 3α-hidroxi-4α-((1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-il)-carboxílico) tropano; 8. Vacinina B ou 6α-hidroxi-4α-((1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-il)-carboxílico) tropano; | Zanolari et al. (2005) |

| | | | |
|--------------------------------------|-----------------|---|-------------------------|
| <i>E. zeylanicum</i> O. E. Schulz | Folhas | <p>9. <i>N</i>-óxido de Catuabina E ou 3α,6β-di((1-metil-1<i>H</i>-pirrol-2-il)-carboxílico)-<i>N</i>-óxido tropano.</p> <p>8 flavonóides glicosilados:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo (4',7-dimetilquercetina-3-O-rutinosídeo-5-O-glicosídeo); 2. Quercetina-di-3,7-O-ramnosídeo; 3. Rutina; 4. Canferol-7-O-malonilarabinosídeo; 5. Quercetina; 6. Quercetina-3-O-cumaroil diglucosil ramnosídeo; 7. Canferol-7-O-ramnosídeo; 8. 4',7-dimetilquercetina-3-O-cumaroil glicosídeo. | Negri et al. (2016) |
| | Casca | <p>5 moléculas:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Cafeoil glucosídeo 2. Cinchonaína IIa; 3. Cinchonaína Ia; 4. Cinchonaína IIa glucosídeo; 5. Cinchonaína Ib. | Negri et al. (2016) |
| | Folhas e galhos | <p>2 alcalóides tropânicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Eritrozeilanina C <i>cis</i> ou <i>cis</i>-6β-acetoxi-3α-(cinamoico)-tropano ; 2. Eritrozeilanina C <i>trans</i> ou <i>trans</i>-6β-acetoxi-3α-(cinamoico)-tropano. | Bringmann et al. (2000) |
| | Raiz | <p>4 alcalóides tropânicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Eritrozeilanina A ou 1R,3R,5S,6R-6-acetoxi-3-(3',4',5'-trimetoxibenzoico)-tropano; 2. 3α-(3',4',5'-trimetoxibenzoico)-tropano; 3. Eritrozeilanina B <i>cis</i> ou <i>cis</i>-3β-(cinamoiloxi)-tropano; 4. Eritrozeilanina B <i>trans</i> ou <i>trans</i>-3β-(cinamoiloxi)-tropano. | Bringmann et al. (2000) |

De acordo com os estudos realizados, os alcalóides tropânicos são os principais metabólitos secundários encontrados no gênero *Erythroxylum*, principalmente os esterificados. Embora eles sejam a maioria, alguns autores não detectaram a presença desses compostos em determinadas espécies, como por exemplo o estudo de Negri et al. (2016) com *E. vacciniifolium*, apesar de ter sido relatada a presença destes em outro estudo com a mesma espécie feito por Zanolari (2003)a. Negri et al. (2016) argumentam que as condições utilizadas poderiam não ter sido adequadas para a extração de alcalóides tropânicos, como as

condições de pH por exemplo, logo, é necessário que se tenha em mente a finalidade do estudo antes de escolher a melhor metodologia de extração.

Uma revisão de Oliveira et al. (2010) faz uma compilação do conhecimento sobre os dados espectrais de ^{13}C -NMR de 186 alcalóides tropânicos, distribuídos em 35 espécies do gênero *Erythroxylum*, informações que podem orientar os estudos para a detecção destas moléculas, visto que a estrutura molecular de muitos dos alcaloides isolados ainda não foi totalmente elucidada.

Conhecer estas moléculas é o caminho para compreender a evolução das espécies desta família, a biossíntese dessas estruturas e, principalmente, como elas interagem com os componentes abióticos e bióticos do ecossistema (Wink, 2003). Não existe nenhum estudo com espécies de *Erythroxylum* que aborde como estas moléculas interagem com o ambiente, embora esta seja a melhor forma de traçar estratégias de conservação para o uso seguro deste recurso.

Os estudos ecológicos que abordam estas interações com o ambiente ainda são raros, mas eles demonstram como variáveis bióticas e abióticas produzem respostas adaptativas na produção dos metabólitos pela planta, como herbivoria, radiação, disponibilidade de água, entre outras. Isto pode ocorrer tanto quantitativa quanto qualitativamente. Membros de uma mesma espécie podem se diferenciar em quimiotipos, produzindo moléculas distintas que são o ponto chave dos eventos de especiação, pois conferem as diferenças adaptativas sobre as quais a seleção natural atua formando novas espécies. As taxas de extinção também estão relacionadas com a diversidade molecular e as variações ambientais. Quanto menor a diversidade de moléculas e quimiotipos, maior a probabilidade de extinção em condições adversas (Wink, 2003).

A biossíntese de alguns metabólitos secundários pode ser restrita a uma única família, a um gênero ou a uma única espécie. Esses metabólitos são inclusive muito utilizados na quimiotaxonomia, porque refletem a filogenia do grupo (Berkov, 2014; Campbell, 2003). Griffin e Lin (2000) discutem a quimiotaxonomia dos alcaloides tropânicos de Erythroxylaceae e descrevem a sua distribuição geográfica. O estudo também inclui as famílias Solanaceae, Proteaceae, Euphorbiaceae, Rhizophoraceae, Convolvulaceae e Cruciferae. Posteriormente, Simone et al. (2008) também fez uma revisão sobre os alcaloides tropânicos nestas mesmas famílias e ainda inclui Moraceae, as semelhanças entre eles refletem a evolução convergente que levou ao aparecimento destas moléculas, provavelmente devido à diversidade de estruturas e atividades biológicas que apresentam.

Todos estes estudos sobre os alcaloides não são em vão, eles refletem o quão são complexas essas vias biossintéticas. A seleção natural pode utilizar fontes distintas para produzir moléculas com estrutura e ações biológicas similares, no estudo de Jirschitzka et. al. (2012) há evidências de que os alcaloides tropânicos evoluíram de forma independente nas famílias Erythroxylaceae e Solanaceae, um caso curioso de evolução convergente. Todavia, as origens filogenéticas dos alcaloides tropânicos em *Erythroxylum* aparentemente são as mesmas. Ainda é cedo para afirmar, mas algumas evidências suportam o conceito de etapas biossintéticas comuns, como a ocorrência simultânea de uma estrutura de 3 α -hidroxi ou 3 β -hidroxitropano, calisteinas, cocaína, outros alcaloides e nicotina (Brock et al. 2005).

Apesar dos pontos positivos acerca dos diversos estudos envolvendo alcaloides tropânicos, como por exemplo, o desenvolvimento de técnicas cada vez mais elaboradas para a extração e a descoberta de novas entidades químicas, existe pouco interesse pela elucidação estrutural de metabólitos de *Erythroxylum* pertencentes a outras classes moleculares. Isso é preocupante, pois as estruturas moleculares da maioria dos metabólitos secundários deste gênero seguem desconhecidas. Os flavonoides, por exemplo, são fundamentais inclusive para conhecer a filogenia do grupo, visto que a quercetina e o campferol, assim como seus derivados 3-glicosídeos, além de possuir atividades biológicas, são características marcantes no gênero, sendo até mesmo utilizados na quimiotaxonomia (Hegnauer, 1981; Inigo e Pomilio, 1985 *Apud*. Barreiros et al. 2003).

Concluindo, as espécies deste *taxon* possuem uma vasta biodiversidade molecular, contudo ela está subestimada. Portanto, ainda são necessários muitos estudos fitoquímicos, inclusive os que considerem aspectos ecológicos e investiguem o papel destas moléculas nos ecossistemas naturais, inclusive estudos com a mesma espécie em diferentes ambientes, porque estes podem impor pressões seletivas que implicam em moléculas estrutural e/ou funcionalmente distintas.

3.3 Potencial Terapêutico

A fim de traçar o cenário atual deste *taxa* e discutir as perspectivas para estudos futuros na área da farmacologia moderna, nós vamos dar uma maior atenção aos estudos mais recentes envolvendo o seu potencial terapêutico.

Das mais 240 espécies desta família, poucas foram investigadas, restando ainda muitas outras que continuam sem investigação, inclusive espécies relatadas na medicina popular com diversas propriedades.

Diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstraram o potencial em atividades biológicas de certas espécies (Tabela 3), mas na maioria não foram identificadas as moléculas responsáveis por tais atividades. Além disso, nenhum estudo abordou o possível sinergismo com outras substâncias (extratos de outras plantas ou produtos sintéticos). Entre as espécies investigadas os resultados foram animadores no ramo da terapêutica moderna, sendo os seus alcaloides tropânicos os agentes principais nesse processo. Isto porque os alcaloides são comercialmente significativos pela sua diversidade química e propriedades bioativas (Cordell et al., 2001).

Tabela 3: Atividades terapêuticas investigadas em produtos naturais provindos de espécies de *Erythroxylum*.

| Espécie | Atividade investigada | Substâncias e/ou moléculas testadas | Referência |
|---|---------------------------------|--|--------------------------------|
| <i>Erythroxylum alaternifolium</i> A. Rich. | Citotóxica e antiviral | Extrato hidroalcoólico das folhas. | González-Guevara et al. (2004) |
| | Antioxidante | Extratos hexânico, clorofórmico, acetate de etila e butanólico das folhas. | Córdova et al. (2012) |
| <i>Erythroxylum anguifugum</i> | Anticancer | Extrato bruto da casca do caule. | Martins (2014) |
| <i>Erythroxylum areolatum</i> Linn. | Citotóxica e antiviral | Extrato hidroalcoólico das folhas. | González-Guevara et al. (2004) |
| <i>Erythroxylum caatingae</i> Plowman | Antimicrobiana | Extrato metanólico do caule, suas frações e dois alcaloides isolados. | Aguiar et al. (2012) |
| | Citotóxica | Extrato metanólico do caule e um alcaloide isolado, a Catuabina B. | Oliveira et al. (2012) |
| | Antitumoral | Extrato metanólico do caule. | Oliveira et al. (2012) |
| | Anti-hipertensiva | Extrato metanólico das folhas. | Reis et al. (2012) |
| | Antinociceptiva | Extrato metanólico das folhas. | Maia et al. (2014) |
| | Relaxante | Extrato etanólico das folhas. | Santos et al. (2016) |
| | <i>Erythroxylum citrifolium</i> | Anti-HIV e suas enzimas essenciais. | Extrato aquoso do caule. |
| <i>Erythroxylum confusum</i> | Citotóxica e | Extrato hidroalcoólico das folhas. | González- |

| | | | | |
|---|--------|---|---|--------------------------------|
| | Britt. | antiviral | | Guevara et al. (2004) |
| | | Citotóxica | Extratos das folhas (Infusão, decocção e hidroalcoólico) e duas frações (acetato de etila e o seu resíduo). | Martinez-Hormaza et al. (2006) |
| | | Hepatoprotetora | Extratos hexânico e hidroetanólico das folhas. | Rodeiro et al. (2008) |
| <i>Erythroxylum daphnites</i> | | Anticancer | Extrato bruto da casca do caule. | Martins (2014) |
| | | Antioxidante | Extratos aquosos, hexânicos e etanólicos das folhas em diferentes épocas do ano. | Martins (2015) |
| | | Antimicrobiana | Extratos hexânico, aquoso (e suas frações metanólica e acetônica) e etanólico (e suas frações aquosa, hexânica e acetato de etila). | Silva (2013) |
| <i>Erythroxylum deciduum</i> | | Antiviral | Extrato aquoso das folhas. | Simoni et al. (2007) |
| <i>Erythroxylum delagoense</i> Schinz | | Antibacteriana | Extractos de acetona, metanol e água quente de folhas e cascas. | Wet (2011) |
| <i>Erythroxylum emarginatum</i> Thonn | | Antibacteriana | Extractos de acetona, metanol e água quente de folhas e cascas. | Wet (2011) |
| <i>Erythroxylum gonocladum</i> | | Anti-hipertensiva | Extrato etanólico das folhas. | Lucas-Filho (2009) |
| | | Antiinflamatória | Extrato etanólico bruto e suas frações (hidrometanólica, hexânica, diclorometanica e acetate de etila). | Gusman et al. (2015) |
| <i>Erythroxylum havanense</i> Jacq. | | Citotóxica e Antiviral | Extrato hidroalcoólico das folhas. | González-Guevara et al. (2004) |
| <i>Erythroxylum hypericifolium</i> Lam. | | Antioxidante e sequestradora de radicais livres | Extratos de metanol e diclorometano de folhas e caules (em conjunto). | Poullain et al. (2004) |

| | | | |
|--|--|--|--|
| <i>Erythroxylum laurifolium</i> Lam. | Anti-herpética Inibidora da α -amilase e da α -glucosidase. | Extractos enriquecidos com taninos condensados das folhas e caules. Extratos metanólico e aquoso. | Lohezic et al. (1999) Picot et al. (2014) |
| <i>Erythroxylum lucidum</i> HBK. | Tóxica, antitumoral, citotóxica e capacidade de se intercalar com o DNA. | Extrato metanólico dos ramos. | Gupta et al. (1996) |
| <i>Erythroxylum macrocarpum</i> | Antimicrobiana | Extrato metanólico das folhas e galhos. | Mahomoodally et al. (2005) |
| <i>Erythroxylum minutifolium</i> | Antigenotóxica | Extrato etanólico das folhas. | Leyva et al. (2003) |
| | Antibacteriana | Extrato etanólico dos frutos. | Toledo-Castro et al. (2008) |
| | Hepatoprotetora | Extratos hexânico e hidroetanólico das folhas. | Rodeiro et al. (2008) |
| <i>Erythroxylum novogranatense</i> var. <i>truxillense</i> | Antibacteriana | Extrato hidroalcoólico das folhas. | Villanueva e Nakata (2010) |
| | Antibacteriana | Extratos aquoso e etanólico das folhas. | Pastor (2011) |
| <i>Erythroxylum nummularia</i> | Antioxidante | Substâncias Isoladas das folhas | Barreiros et al. (2003) |
| <i>Erythroxylum passerinum</i> | Citotóxica em células astrocíticas. | Dois terpenos isolados do fruto: AEP-1 e Lupeol. | Menezes-Filho (2012) |
| <i>Erythroxylum pervillei</i> | Citotóxica; Inibidora da | Nove alcalóides extraídos da raiz. Quatro alcalóides extraídos da raíz. | Silva et al. (2001) Silva et al. (2001) |

| | | | |
|--|--|--|---|
| | resistência a múltiplos medicamentos; Reversora da resistência a múltiplas drogas. | Dois ésteres aromáticos de alcaloides tropânicos extraídos de raiz: Pervileinas B e C. | Mi et al. (2002) |
| <i>Erythroxylum pictum</i> | Antibacteriana | Extratos de água quente, acetone e metanol das folhas e cascas. | Wet (2011) |
| <i>Erythroxylum pungens</i> O.E. Schulz | Vasorelaxante | Extrato das raízes e seu principal alcalóide tropânico, a pungencina. | Oliveira et al. (2012) |
| <i>Erythroxylum rimosum</i> | Antioxidante e Tóxica | Frações do extrato metanólico das folhas (hexânica, clorofórmica e acetato de etila). | Ribeiro (2011) |
| <i>Erythroxylum suberosum</i> A. St.Hil | Antimicrobiana e Citotóxica | Extrato etanólico da casca do caule e suas frações. | Violante (2008) e Violante et al. (2012). |
| | Inibidora das catepsinas K, L e V (envolvidas no desenvolvimento de osteoporose, câncer de pele e aterosclerose, respectivamente). | Extratos etanólicos das folhas, caules e raiz, suas frações e o flavonóide quercetina. | Nascimento (2014) |
| | Anti-hipertensiva | Extrato etanólico das folhas. | Lucas-Filho (2009) |
| | Antiinflamatória | Extrato etanólico bruto e suas frações (hidrometanólica, hexânica, diclorometanica e acetate de etila). | Gusman et al. (2015) |
| <i>Erythroxylum subrotundum</i> | Citotóxica | Extratos aquoso, etanólico e hexânico das folhas. Foram analisadas também as frações acetate de etila e hexano:acetato de etila do hexânico. | Santos (2014) |
| | Antimicrobiana | Extratos aquoso, hexânico e etanólico das folhas. | Silva (2013) |

| | | | |
|-------------------------------|-------------------|---|----------------------|
| <i>Erythroxylum tortuosum</i> | Anti-hipertensiva | Extrato etanólico das folhas. | Lucas-Filho (2009) |
| | Antiinflamatória | Extrato etanólico bruto e suas frações (hidrometanólica, hexânica, diclorometânica e acetate de etila). | Gusman et al. (2015) |

4. Considerações Finais

O gênero demonstra um alto potencial para a indústria farmacêutica, uma vez que possui uma grande diversidade de metabólitos que se demonstraram bioativos contra diversas enfermidades. Muitos povos tradicionais relatam usos medicinais que ainda não foram investigados e a probabilidade de se encontrar novas moléculas bioativas é alta. Quando aliamos isto ao fato de que ele possui distribuição pantropical, com espécies que demonstram grande versatilidade ecológica e diversidade química, podemos presumir elas são excelentes objetos de estudo, principalmente para os pesquisadores em farmacologia de produtos naturais e quimioecologia. A vasta variabilidade estrutural encontrada, no entanto, é um indício de que estas espécies podem ser resistentes às condições adversas impostas pelo ambiente, como o uso antrópico por exemplo. Para atender as demandas industriais sem prejudicar a capacidade de sobrevivência da espécie no ecossistema, são necessários conhecimentos acerca do rendimento do processo de extração do produto natural e, principalmente, sobre o metabolismo da espécie em questão, reprodução, dinâmica populacional e relações ecológicas. Logo, o potencial terapêutico das espécies deste gênero é inegável, mas a utilização pela indústria farmacêutica deve seguir planos de manejo específicos.

5. Referências

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.18, p.472-508, 2008.

AGUIAR, J. S. Estudo das Atividades Antimicrobiana e Anticâncer de *Erythroxylum caatingae* Plowman e *Erythroxylum subrotundum* A.St.-Hil. Tese apresentada ao Programa

de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2011.

AGUIAR, J. S.; ARAÚJO, R. O.; RODRIGUES, M. do D.; SENA, K. X. F. R.; BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P.; OLIVEIRA, S. L.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; NASCIMENTO, S. C.; SILVA, T. G. da. Antimicrobial, Antiproliferative and Proapoptotic Activities of Extract, Fractions and Isolated Compounds from the Stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 4124-4140, 2012.

ALBUQUERQUE, C. H.; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, S. L.; SILVA, T. S.; GONÇALVES, G. F.; COSTA, V.C.O.; AGRA, M.F.; PESSÔA, H.L.F.; SILVA, M. S. Flavonóides Glicosilados de *Erythroxylum pulchrum* St. Hil. (Erythroxylaceae). **Química Nova**, v. 37, n.4, 2014.

AL-SAID, M. S.; EVANS, W. C.; GROUT, R. J. Alkaloids of *Erythroxylum macrocarpum* and *E. sideroxyloides*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 4, p. 851-853, 1986.

AL-SAID, M. S.; EVANS, W. C.; GROUT, R. J. Alkaloids of *Erythroxylum hypericifolium* stem bark. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 671-673, 1989.

ÁLVAREZ-REYES, A.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; URQUIOLA-CRUZ, A. Evaluación fitoquímica de *Erythroxylum confusum* Britt. (Erythroxylaceae) al variar el método de secado de las hojas. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, v. 39, n. 3, 2008.

BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N. Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu – sudeste do Pará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 47-49, 2003.

BARREIROS, A. L. B. S. et. al. Atividade antioxidante de substâncias presentes em *Dioclea violacea* e *Erythroxylum numulária*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, 2003.

BERKOV, S.; MUTAFOVA, B.; CHRISTEN, P. Molecular biodiversity and recent analytical developments: A marriage of convenience. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1102-1110, 2014.

BEYRA, A.; LEÓN, M. C.; IGLESIAS, E.; FERRÁNDIZ, D.; HERRERA, R.; VOLPATO, G.; GODINEZ, D.; GUIMARAIS, M.; ÁLVAREZ, R. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales em la província de Camaguey (Cuba). **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 61, n. 2, p. 185-204, 2004.

BRINGMANN, G.; GUNTHER, C.; MUHLBACHER, J.; LALITH, M.D.; GUNATHILAKE, P.; WICKRAMASINGHE, A. Tropane alkaloids from *Erythroxylum zeylanicum* O. E. Schulz (Erythroxylaceae). **Phytochemistry**, v. 53, p. 409-416, 2000.

BROCK, A.; BIERI, S.; CHRISTEN, P.; DRAGER, B. Calystegines in wild and cultivated *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, v. 66, p.1231-1240, 2005.

CAMPBELL, A.K. Rubicon: the Fifth Dimension of Biology, p. 304. Duckworth, London. 1994.

CAMPBELL, A. K. Save those molecules! Molecular biodiversity and life. **Journal of Applied Ecology**, v. 40, p. 193-203, 2003.

CANO, J. H.; VOLPATO, G. Herbal mixtures in the tradicional medicine of Eastern Cuba. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 293-316, 2004.

CHIN, Y.W.; JONES, W.P.; WAYBRIGHT, T.J.; McCLOUD, T. G.; RASOANAIVO, P.; CRAGG, G.M.; CASSADY, J.M.; KINGHORN, A.D. Tropane Aromatic Ester Alkaloids from a Large-Scale Re-collection of *Erythroxylum pervillei* Stem Bark Obtained in Madagascar. **Journal of Natural Products**. v.69, p. 414-417, 2006.

CORDELL, G. A.; COLVARD, M. D. Natural products in a world out-of-balance. **ARKIVOC**, v. 7, p. 97-115, 2007.

CORDELL, G.A.; QUINN-BEATTIE, M.L.; FRANSWORTH, N.R. The Potential of Alkaloids in Drug Discovery. **Phytotherapy Research**, v.15, p.183–205, 2001.

CÓRDOVA, P. W.H.; MISLÉN, G. M.; JESSICA, T.; ARNAUD, S.; CLAIRE, K.; JACQUES, D. In vitro Characterization of Antioxidant properties of Cuban Endemic Varieties of *Erythroxylum alaternifolium* A. Rich. Isolation of Two Flavonol Glycosides. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 57, n. 4, 2012.

CORRÊA, P.C. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984, 6v.

DALY, D. 2004. Erythroxylaceae. pp.143-145. In: N. Smith; S.A. Mori, A. Henderson et al. (eds.). **Flowering Plants of Neotropics**. USA, The New York Botanical Garden. Princeton University Press.

FAIRLEY, H. B. La “anestesia” em el império incaico. **Revista Espanola de Anestesiologia y Reanimacion**, v. 54, p. 556-562, 2007.

GIORGETTI, M.; ROSSI, L.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the Central Nervous System: A study of historical sources from the 16th to 19th century. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p.537-555, 2011.

GONZÁLEZ-GARCÍA, K.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; GONZÁLEZ-GUEVARA, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S. Género *Erythroxylum*: Análisis de la información científica. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 24, n.2, p. 284-90, 2005.

GONZÁLEZ-GUEVARA, J. L.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J.A.; PINO-RODRÍGUEZ, S.; GARCÍA-TORRES, M.; CARBALLO-GONZÁLEZ, M.T.; ECHEMENDIA-ARANA, O.A.; MOLINA-TORRES, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S. Phytochemical screening and in vitro antihyperthermic activity of four *Erythroxylum* species. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, 2004.

GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; GONZÁLEZ-GARCÍA, N.; ALVAREZ-GORDO, O.; VÉLEZ-CASTRO, H. Una Entidad Química Aislada de *Erythroxylum confusum* Britton: Palmitato de β - amirina. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n. 1, 2008.

GUSMAN, G. S.; CAMPANA, P.R.V.; CASTRO, L.C.; CASTILHO, R.O.; TEIXEIRA, M.M.; BRAGA, F.C. Evaluation of the Effects of Some Brazilian Medicinal Plants on the Production of TNF- α and CCL2 by THP-1 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

GRIFFIN, W.J. ; LIN, G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, v. 53, p.623-637, 2000.

GUARIM-NETO, G. Estudo etnobotânico em uma área de Cerrado no município de Acorizal, Mato Grosso. **FLOVET**, v. 1, p.5-32, 2009.

GULDBRANDSEN, N.; MIERI, M.; GUPTA, M.; SEISER, T.; WIEBE, C.; DICKHAUT, J.; REINGRUBER, R.; SORGENFREI, O.; HAMBURGER, M. Screening of Panamanian Plant Extracts for Pesticidal Properties and HPLC-Based Identification of Active Compounds. **Scientia Pharmaceutica**, v. 83, p. 353–367, 2015.

GUPTA, M. P.; MONGE, A.; KARIKAS, G.A.; CERAIN, A.L.; SOLIS, P.N.; LEON, E.; TRUJILLO, M. SUAREZ, O.; WILSON, F.; MONTENEGRO, G.; NORIEGA, Y.; SANTANA, A.I.; CORREA, M.; SANCHEZ, C. Screening of Panamanian Medicinal Plants for Brine Shrimp Toxicity, Crown Gall Tumor Inhibition, Cytotoxicity and DNA Intercalation. **International Journal of Pharmacognosy**, v.34, p. 19-27, 1996.

HEGNAUER, R. Chemotaxonomy of Erythroxylaceae (including some ethnobotanical notes on Old World species). **Journal of Ethnopharmacology**, v.3, p.279-292, 1981.

INIGO, R.P.A.; POMILIO, A.B. Flavonoids from *Erythroxylon Argentinum*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 347-349, 1985.

JAYAWEERA, D. M. A. *Medicinal Plants (Indigenous and Exotic) Used in Ceylon*, Part II; The National Science Council of Sri Lanka: **Colombo**, 1980; pp 188-189.

JIRSCHITZKA, J.; SCHMIDT, G.W.; REICHEL, M.; SCHNEIDER, B.; GERSHENZON, J.; D'AURIA, J.C. Plant tropane alkaloid biosynthesis evolved independently in the Solanaceae and Erythroxylaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. 10304-10309, 2012.

JOHNS, S. R.; LAMBERTON, J. A.; SIOUMIS, A. A. Tropine 3,4,5-trimethoxycinnamate, a new alkaloid from *Erythroxylum ellipticum* (Erythroxylaceae). **Australian Journal of Chemistry**, v. 23, 1970.

KHATTAK, K. F.; CHOUDHARY, M.I.; HEMALAL, K.D.; TILLEKERATNE, L.M. New tropane alkaloids from *Erythroxylum moonii*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 929-931, 2002.

KUHLMANN, M. Frutos e sementes do cerrado atrativos para a fauna: guia de campo. Brasília: **Rede de Sementes do Cerrado**, 2012, 360p.

LEYVA, O.; ALONSO, A.; ROSARIO, L. A.; DÍAZ, A.; PRADO, Y.; RODEIRO, I.; ARENCIBIA, D. F. Evaluación antigenotóxica del extracto etanólico de *Erythroxylum minutifolium* grises utilizando el ensaio SOS. **Revista de Toxicología em Línea**, p. 36-48, 2003.

LOHEZIC, F.; AMOROS, M.; BOUSTE, J.; GIRRE, L. In-vitro Antiherpetic Activity of *Erythroxylon laurifolium* (Erythroxylaceae). **Pharmacy and Pharmacology Communications**, v. 5, p. 249-253, 1999.

LUCAS-FILHO, M. D. Estudo Fitoquímico de Espécies do Gênero *Erythroxylum* com Potencial Atividade Vasodilatadora e Inibidora da Enzima Conversora de Angiotensina. **Dissertação** Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto. 2009.

MADALENO, I. M. ; DELATORRE-HERRERA, J. Medicina popular de Iquique, Tarapacá. **IDESIA** (Chile) v. 31, n. 1, p. 67-78, 2013.

MAIA, A. K. H. L.; QUEIROZ, R. B. de; FONSÊCA, D. V. da; PINHO, A. S.; SANTOS, S. G. dos; ALENCAR, J. L. de; TAVARES, J. F.; ALMEIDA, R. N. de; MORAIS, L. C. S. L. de. Antinoceptive activity of the extract of *Erythroxylum caatingae*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13 (2), p. 152-162, 2014.

MAHOMOODALLY, M. F.; GURIB-FAKIM, A.; SUBRATTY, A.H. Antimicrobial Activities and Phytochemical Profiles of Endemic Medicinal Plants of Mauritius. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, p. 237–242, 2005.

MAIA, A. K. H. L.; QUEIROZ, R. B. de; FONSÊCA, D. V. da; PINHO, A. S.; SANTOS, S. G. dos; ALENCAR, J. L. de; TAVARES, J. F.; ALMEIDA, R. N. de; MORAIS, L. C. S. L. de. Antinoceptive activity of the extract of *Erythroxylum caatingae*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13 (2), p. 152-162, 2014.

MARTÍNEZ-HORMAZA, I.; QUINTERO-RODRÍGUEZ, G.; MÁRQUEZ-MONTIEL, L.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J.A.; ÁLVAREZ-REYES, A.; ZARRAGOITÍA, A. Determinación de la Citotoxicidad de Extractos de *Erythroxylum confusum* Britt. mediante el Método de la *Artemia salina*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 3, 2006.

MARTINS, L. A. V. Avaliação do Potencial Anticâncer de Espécies Vegetais de Mato Grosso do Sul. **Dissertação** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande-MS. 2014.

MARTINS, D. H. N. Avaliação da Sazonalidade de Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante de Folhas de *Erythroxylum daphnites* Mart. **Dissertação** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. 2015.

MATSUSE, I.T.; LIM, Y.A.; HATTORI, M.; CORREA, M.; GUPTA, M.P. A search for anti-viral properties in Panamanian medicinal plants: The effects on HIV and its essential enzymes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, 1999.

MENEZES-FILHO, N. J. Determination of cytotoxic effects of terpenes presente in plants from the genus *Erythroxylum* in models of astrocytic cells. **Dissertação** apresentada à Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2012.

MI, Q.; CUI, B.; SILVA, G. L.; LANTVIT, D.; LIM, E.; CHAI, H.; HOLLINGSHEAD, M. G.; MAYO, J. G.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M. Pervilleines B and C, new tropane alkaloid aromatic esters that reverse the multidrug-resistance in the hollow fiber assay. **Cancer Letters**, v. 184, p.13-20, 2002.

NANDAGOAPALAN, V.; MARIMUTHU, C.; DOSS, A. Diversity of tradicional medicinal plants used by rural community in Tiruchirappalli District, Tamilnadu, South India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 12, p. 767-776, 2015.

NASCIMENTO, M. N. G. Estudo Químico de *Erythroxylum suberosum* (Erythroxylaceae) frente às catepsinas K, L e V. **Dissertação** apresentada ao programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Química da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão, GO. 2014.

NEGRI, G.; ALMONDES, J.G.S.; GALVÃO, S.M.P.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; CAVALCANTI, P.M.S. Avaliação da composição química e efeitos toxicológicos de extratos etanólicos de casca e folhas de *Erythroxylum vacciniifolium* em modelos *in vivo*. **Revista Ciência & Saúde**, v. 1, n. 1, p. 17-31, 2016.

NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; SONODA, M.; IWASA, K.; KATO, A.; JUMA, F.D.; MATHENGE, S.G.; MUTISO, P.B.C. Tropane alkaloids from *Erythroxylum emarginatum*. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, p.56-58, 2007.

OLIVEIRA, S. L.; SILVA, M.S.; TAVARES, J.F.; SENA-FILHO, J.G.; LUCENA, H.F.; ROMERO, M.A.; BARBOSA-FILHO, J.M. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum* Genus: Distribution and Compilation of ¹³C-NMR Spectral Data. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p.302-326, 2010.

OLIVEIRA, S. L. Fitoquímica de Espécies de *Erythroxylum* do Semiárido: Isolamento e determinação estrutural de alcaloides, tropanicos, flavonoides e diterpenos. **Tese** apresentada

ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2012.

OLIVEIRA, A. C.; SENA-FILHO, J.G.; MENDES-JÚNIOR, L.G.; ANJOS, R.M.; RIBEIRO, T.P.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BRAGA, V.A.; MEDEIROS, I.A. *Erythroxylum pungens* elicits vasorelaxation by reducing intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells of rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.22, p. 436-442, 2012.

PASTOR, C. B. V. Efecto Inhibitorio in Vitro del Extracto Acuoso y el Extracto Etanólico de la Hoja de *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense* (Coca) sobre el Crecimiento de *Streptococcus mutans*. TCC de Medicina apresentado a Universidade Nacional de Trujillo, Perú, 2011.

PAULA, P. H. S. Estudo Fitoquímico da Fracção Hexânica das Folhas de *Erythroxylum deciduum* (Erythroxylaceae). TCC de Química Industrial apresentado a Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2012.

PAYO-HILL, A. L.; SUAREZ, M.O.; CASTRO, H.T.V.; AQUINO, R.P.; DOMINGUEZ, R.S.; BATISTA-BAEZ, M.; RASTRELLI, L. Tropane alkaloids from the leaves and stem bark of *Erythroxylon alaternifolium* and *Erythroxylum rotundifolium*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 927-932, 2000.

PICOT, C.M.N.; SUBRATTY, A.H.; MAHOMOODALLY, F. Inhibitory Potential of Five Traditionally Used Native Antidiabetic Medicinal Plants on α -Amylase, α -Glucosidase, Glucose Entrapment, and Amylolysis Kinetics In Vitro. **Advances in Pharmacological Sciences**.

POULLAIN, C.; GIRARD-VALENCIENNES, E.; SMADJA, J. Plants from Reunion Island: Evaluation of their Free Radical Scavenging and Antioxidant Activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p.19-26, 2004.

PUNTES, J. P.; HURRELL, J. A. Plantas andinas y sus productos comercializados con fines medicinales y alimentarios em el Área Metropolitana Buenos Aires-La Plata, Argentina.

Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, v. 14, n. 3, p. 206-236, 2015.

RASOANAIVO, P.; RAKOTONANDRASANA, O.L.; RAMANITRAHASIMBOLA, D.; RATSIMAMANGA, S. Traditional medicine and resistance modulators.

Ethnopharmacologie, n. 35, p.33-38, 2005.

REIS, M. R.; ALBUQUERQUE, J.M.; TAVARES, J.F.; SILVA, D.F. Efeito vasodilatador do extrato metanólico de *Erythroxylum caatingae* Plowman sobre anéis mesentéricos de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.11, n.2, 2012.

RIBEIRO, E. M. O. Estudo fitoquímico de *Erythroxylum rimosum* O.E.Schulz e *Erythroxylum betulaceum* Mart. (Erythroxylaceae). **Tese** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, 2011.

RODEIRO, I.; DONATO, M.T.; MARTÍNEZ, I.; HERNÁNDEZ, I.; GARRIDO, G.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J.A.; MENÉNDEZ, R.; LAGUNA, A.; CASTELL, J.V.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. Potential hepatoprotective effects of new Cuban natural products in rat hepatocytes culture. **Toxicology in Vitro**, v. 22, 2008.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E. L. A. Plants with possible psychoactive actions used by the Krahô Indians, Brazil. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 28, n.4, p.277-82, 2006.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001, 180p.

SALGADO, E. R. Las ramas floridas del bosque: Experiências em el manejo de plantas medicinales amazônicas. **IQUITOS**: Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana, 2007.

SANTOS, C. C. Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil: *Erythroxylum barbatum* O. E. Schulz, *Erythroxylum amplifolium* (Mart.) O. E. Schulz

(Erythroxylaceae) e *Croton sonderianus* Muell Arg. (Euphoribaceae). **Tese** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

SANTOS, B. T. A. Estudo da Atividade dos Extratos de Plantas e Fungos Endofíticos Isolados do Cerrado Brasileiro em Linhagem Celular de Feocromocitoma. **Dissertação** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília. 2014.

SANTOS, K. C.; MONTE, A.P.; LIMA, J.T.; RIBEIRO, L.A.; PALHETA-JUNIOR, R.C. Role of NO–cGMP pathway in ovine cervical relaxation induced by *Erythroxylum caatingae* Plowman. **Animal Reproduction Science**, 2016.

SENTHILKUMAR, M.; GURUMOOTHY, P.; JANARDHANAN, K. Some medicinal plants used by Irular, the tribal people of Marudhamalai hills, Coimbatore, Tamil Nadu. **Natural Product Radiance**, v. 5, n. 5, p. 382-388, 2006.

SILVA, G. L.; CUI, B.; CHÁVEZ, D.; YOU, M.; CHAI, H.; RASOANAIVO, P.; LYNN, S. M.; O'NEILL, M.; LEWIS, J. A.; BESTERMAN, J. M.; MONKS, A.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; KIGHORN, A. D. Modulation of the Multidrug-Resistance Phenotype by New Tropane Alkaloid Aromatic Esters from *Erythroxylum pervillei*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1514-1520, 2001.

SILVA JÚNIOR, M.C.S. 100 Árvores do Cerrado: guia de Campo. Brasília: **Rede de Sementes do Cerrado**, 2005, 278p.

SILVA, S. M. M. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Espécies Vegetais do Bioma Cerrado. **Dissertação** de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. 2013.

SILVA, A. F.; RABELO, M. F. R.; ENOQUE, M. M. Diversidade de angiospermas e espécies medicinais de uma área de Cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n.4, p.1016-1030, 2015.

SIMONE, R.; MARGARUCCI, L.; FEO, V. Tropane alkaloids: An Overview.

Pharmacology online, v.1, p.70-89, 2008.

SIMONI, I. C.; MANHA, A.P.S.; SCIESSERE, L.; HOE, V.M.H.; TAKINAMI, V.H.;

FERNANDES, M.J.B. Evaluation of the Antiviral Activity of Brazilian Cerrado Plants

Against animal viroses. **Virus Reviews & Research**, v. 12, 2007.

SOARES-NETO, J. A. R.; KATO, E.M.; BUGNO, A.; GALDURÓZ, C.F.; MARQUEZ, L.C.; MACRINI, T.; RODRIGUES, R. Informal Trade of Psychoactive Herbal Products in the City of Diadema, SP, Brazil: Quality and Potential Risks. **Evidence-Based**

Complementary and alternative Medicine, 2013.

TOLEDO-CASTRO, S. M. *et. al.* Phytochemical and pharmacological evaluation of the fruits of *Erythroxylum minutifolium* Griseb. (Erythroxylaceae). **Revista Cubana Plantas**

Medicinales, v.13, n.2, Ciudad de la Habana, 2008.

URIGÜEN, L.; CALLADO, L. F. Cocaína y cerebro. **Elsevier España**, Bizkaia, v. 12 (4), p.129-134, 2010.

VENKATACHALAPATHI, A.; THEKKAN, S.; PAULSAMY, S. Ethnobotanical informations on the species of selected areas in Nilgiri Biosphere Reserve, the Western Ghats, Índia. **Journal of Research in Biology**, v. 5, p.043-057, 2015.

VILLANUEVA, V. A.; NAKATA, H. M. Plantas medicinales: Efecto antibacteriano *in vitro* de *Plantago major* L., *Erythroxylum novogranatense* Plowman var. *truxillense* y *Camellia sinensis* sobre bacterias de importância estomatológica. **Odontologia Sanmarquina**, v. 13, n.2, 2010.

VIOLANTE, I. M. P. Avaliação do Potencial Antimicrobiano e Citotóxico de Espécies Vegetais do Cerrado da Região Centro-Oeste.Campo Grande, 2008. **Dissertação** apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande-MS. 2008.

WET, H. de. Antibacterial activity of the five South African *Erythroxylaceae* species. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 11511-11514, 2011.

WINK, M. Evolution of Secondary Metabolites from an Ecological and Molecular Phylogenetic Perspective. **Phytochemistry**, v. 64, p.3-19, 2003.

ZANOLARI, B.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E.F.; PAULO, M.Q.; HOSTETTSMANN, K. Tropane alkaloids from the Bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 497-502, 2003a.

ZANOLARI, B.; WOLFENDER, J.L.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E.F.; PAULO, M.Q.; HOSTETTSMANN, K. On-line identification of tropane alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography-UV detection-multiple mass spectrometry and liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n.1020, p.75-89, 2003b.

ZANOLARI, B.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E.F.; PAULO, M.Q.; HOSTETTSMANN, K. Methylpyrrole Tropane Alkaloids from the Bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1153-1158, 2005.

ZHAO, Y.; WU, Y.; WANG, M. Bioactive substances of plant origin. **Handbook of Food Chemistry**, 2014.

ZUANAZZI, J.A.S.; TREMEA, V.; LIMBERGER, R.P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A.T. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p.819-825, 2001.

4. 2 - Artigo científico II

Artigo científico a ser encaminhado à Revista **Phytomedicine**.

Todas as normas de redação e citação, doravante, atendem as estabelecidas pela referida revista, exceto o idioma.

Efeito Antibacteriano e Modificador da Resistência Bacteriana do Extrato Bruto e da Fração Alcaloídica de *Erythroxylum revolutum* Mart. em Combinação com Antibióticos Convencionais

Maísa F. S. Barbosa^a, Irwin R.A. Menezes^b, Henrique D. M. Coutinho^b, Carlos A. Souza^a, Paulo H. O. Miranda^a, Janaína E. Rocha^b, Camila F. Bezerra^b, Maria S. Costa^b, André L. Melo^a, Rogério A. Saraiva^{a*}

^a Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE.

^b Universidade Regional do Cariri – UFRPE.

Resumo

O fenômeno da resistência microbiana frente a antibióticos tem se tornado um dos maiores problemas de saúde pública do mundo. Muitos estudos envolvendo combinações entre extratos de plantas e drogas convencionais tem se demonstrado eficazes na modificação desta resistência e potencialização do efeito destas drogas. Neste estudo testamos o extrato etanólico de *E. revolutum* e a fração de alcaloides, sozinhos e combinados com antibióticos convencionais contra cepas sensíveis e resistentes de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica da microdiluição em placas de 96 poços. Também foi realizada uma prospecção fitoquímica e um teste de toxicidade em tecido hepático de *Mus musculus* pelo reagente MTT em ambos os produtos. A fitoquímica apontou a presença de alcaloides, flavonoides, esteroides, taninos e antraquinonas no EER e a análise de CG-EM na fração de alcaloides indicou a presença de dois alcaloides tropanicos. Nossos resultados demonstram que ambos os produtos possuem baixa toxicidade. A fração de alcaloides apresentou o melhor resultado, diminuindo a CIM da Gentamicina frente à *S. aureus* em 84%, sugerindo ser um produto em potencial para o desenvolvimento de novos tratamentos no combate a estas infecções.

Palavras-chave: Biodiversidade, Produtos naturais, Alcaloides tropanicos, Reversão da Resistência.

1. Introdução

A resistência microbiana aos medicamentos existentes é um fenômeno crescente que se tornou uma das maiores ameaças globais à saúde pública, sendo inclusive um dos casos mais bem relatados de evolução biológica, o que torna muitas infecções quase impossíveis de tratar (Prestinaci et al., 2015). *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, por exemplo, representam de 60 a 70% dos casos de infecções nosocomiais em neonatais, sendo inclusive relatados muitos casos de *S. aureus* resistente à metilina (Patel e Saiman, 2010). Outro exemplo é a resistência de *Escherichia coli* às fluoroquinolonas, antibióticos mais utilizados em infecções do trato urinário, existem inclusive países onde tratamento já se tornou ineficaz em mais da metade dos pacientes (WHO, 2014).

Este fenômeno tem sido atribuído principalmente ao uso indiscriminado de antibióticos. Mas outros fatores também contribuem significativamente para o problema, como pacientes imunossuprimidos (pacientes com câncer, AIDS ou recém-transplantados), procedimentos cirúrgicos invasivos e longa permanência em hospitais (Vincent, 2003).

Além do impacto sobre a saúde humana, também se destaca o impacto econômico. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2014), pacientes acometidos por cepas resistentes aos medicamentos, além de consumir mais recursos, correm maior risco de um pior desfecho clínico e morte do que os pacientes acometidos por cepas comuns.

A terapia combinada, também conhecida como terapia sinérgica, envolve a combinação de antibióticos com extratos vegetais. É uma área em potencial para a descoberta de interações novas e o tratamento em pacientes com infecções graves causadas por microorganismos resistentes (Chanda e Rakholiya, 2011). Entre os benefícios estão o aumento da atividade antibacteriana, o tratamento de infecções graves na qual se conhece o agente específico, a redução do tempo necessário para a terapia e a prevenção do aparecimento de resistência, entre outros (Levinson e Jawetz, 2002). Este efeito sinérgico se dá pela formação de misturas complexas, mais eficazes em inibir determinadas espécies de microorganismos, que pode ser através da inibição da síntese da parede celular, lise da membrana e interferência na síntese de ácidos nucleicos e proteínas (Chanda e Rakholiya, 2011).

Erythroxylum revolutum Mart. (Erythroxylaceae) é endêmica da região nordeste do Brasil (Loiola et al., 2007), onde é conhecida como “araçá-bravo” e utilizada por povos tradicionais como afrodisíaca (Agra et al., 2008). Alguns estudos relatam o potencial antimicrobiano do gênero *Erythroxylum* (Wet, 2011; Violante et al., 2012; Albuquerque et

al. 2014), mas os mecanismos envolvidos nesta atividade ainda não são bem compreendidos. Além disso, nenhum estudo até o momento avaliou possíveis interações com extratos de espécies deste gênero e drogas antimicrobianas utilizadas no mercado, o que torna a espécie um excelente objeto de estudo.

Neste estudo testamos o extrato etanólico de *Erythroxylum revolutum*, sozinho e em combinação com antibióticos, contra cepas bacterianas sensíveis e resistentes. O objetivo é contribuir para a descoberta de novas drogas capazes de tratar as infecções procovadas por estes agentes ou até mesmo propor novas terapias eficazes que permitam potencializar a ação antimicrobiana de fármacos já usados na clínica.

2. Seção Experimental

2.1 Cepas bacterianas

Para a avaliação da atividade antibacteriana dos produtos sozinhos foram utilizadas as cepas sensíveis e resistentes descritas na Tabela 1 e para a avaliação do possível efeito modificador da resistência foram utilizadas apenas as cepas resistentes.

Tabela 1: Cepas bacterianas utilizadas para os ensaios de avaliação dos efeitos antibacterianos e modificador da resistência.

| Bactérias | Cepas sensíveis | Cepas resistentes |
|-------------------------------|-----------------|-------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 | EC 06 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 6538 | SA 10 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 9027 | PA 24 |

2.2 Drogas

Foram utilizados o aminoglicosídeo Gentamicina, a quinolona Norfloxacin e o macrolídeo Eritromicina, todos obtidos em farmácia e diluídos em água destilada.

2.3 Material vegetal

Folhas de dois indivíduos de *E. revolutum* foram coletadas às 9:30hs do dia 21/03/2017 no município de Serra Talhada, Pernambuco, Brasil (7° 4'29.8" S 38° 18'07.2"

W). A espécie foi identificada pelo taxonomista André Laurênio de Melo e as exsiccatas foram depositadas no HESBRA (Herbário do Semiárido Brasileiro) sob nº 3711. As folhas foram colocadas para secar em estufa a 40°C durante 72 h. Após a secagem as folhas foram trituradas até se obter o pó.

2.4 Preparação do Extrato Etanólico

O extrato de *E. revolutum* (EER) foi obtido a partir da extração a frio do pó (770,97 g) com etanol 96% seguindo a metodologia adaptada de Oliveira (2012). O etanol foi adicionado ao material até a completa submersão e após 72 h o líquido foi filtrado. O processo foi feito três vezes e, ao final, todo o filtrado foi concentrado em evaporador rotativo a 40°C sob pressão reduzida, colocado em banho-maria a 37° por 72 hs e posteriormente em liofilizador para evaporar o etanol restante.

2.5 Preparação da Fração dos Alcaloides Totais (FAT)

Uma parte do extrato obtido foi submetido a uma extração ácido-base para a obtenção da Fração dos Alcaloides Totais (FAT), seguindo a metodologia adaptada de Tabosa et al. (2000). O extrato (40 g) foi diluído em etanol 96% e esta solução foi acidificada com ácido clorídrico 3% até atingir o pH 2. Em seguida, a mistura foi colocada em funil de separação com acetato de etila e água (1:1) v/v, homogeneizada e deixada descansar até se obter duas fases. A fase acetato de etila foi descartada e a aquosa foi alcalinizada com hidróxido de amônio concentrado até ela atingir o pH 9 e, em seguida, foi adicionado acetato de etila concentrado. A mistura foi homogeneizada e separada da mesma forma, mas desta vez a fase aquosa foi descartada e a fase acetato de etila foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada a vácuo, concentrada em evaporador rotativo a 40°C e, por fim, posta em banho-maria para evaporar todo o solvente restante.

2.6 Prospecção Fitoquímica e análise por CG-EM

Um estudo preliminar foi realizado para a identificação qualitativa dos metabólitos secundários presentes no EER seguindo a metodologia de Matos (2009) com adaptações.

A fração de alcaloides foi submetida a análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrofotometria de Massas (CG-EM) pelo equipamento Thermo Scientific TRACE 1300

acoplado ao ISQ quadruplo, com coluna capilar de sílica fundida DB-5 de dimensões: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. A amostra foi diluída em acetato de etila e foi utilizado Hélio como gás de arraste a uma velocidade de fluxo de 1,0 mL/min, obtendo espectros de massas e cromatogramas. O experimento CG-EM foi realizado no modo de impacto de elétrons, EI a 70 eV. A temperatura do forno foi programada a partir de 60 a 300 °C a razão de 20 °C/min (14 min). Com aquecimento iniciando-se a 60 °C por 3 min, e depois com taxa de aquecimento de 40 °C/min até 100 °C e depois 20 °C/min até 300 °C, temperatura na qual se manteve a isoterma por 2 minutos. A temperatura do injetor e detector foram, respectivamente, de 250 e 280 °C.

2.7 Ensaios antibacterianos

2.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método da microdiluição em caldo seguindo a metodologia adaptada de Saraiva et al. (2011). Antes do experimento, as placas contendo os microrganismos foram incubadas por 24 h a 37 °C. Para o semeio foi utilizado o meio de cultura sólido *Heart Infusion Agar* (HIA). Foram preparados Eppendorfs contendo o meio de cultura líquido *Brain Heart Infusion* (BHI), nos quais também foram inseridos uma suspensão da colônia bacteriana (10^5 UFC/mL em solução salina 0,9% pela escala de MacFarland).

Uma solução-mãe dos produtos (EER e FAT) foi preparada diluindo 0,10 g em 1 mL de DMSO e 8.765 µL de água destilada para atingir a concentração de 1.024 µg/mL. A microdiluição foi realizada em placas de 96 poços onde foi adicionado o meio de cultura, a suspensão bacteriana e os produtos em concentrações que variaram de 512 a 0 µg/mL. O poço equivalente a 0 µg/mL foi utilizado como controle positivo e o controle de esterilidade foi feito com o meio de cultura sozinho. As placas foram incubadas por 24hs a 36°C. O experimento foi realizado em triplicata e a leitura do resultado feita adicionando 20 µL do reagente resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) em cada poço, que muda de cor na presença de células bacterianas viáveis. A CIM foi determinada como a concentração equivalente aos poços em que não houve mudança de coloração do reagente.

2.7.2 Efeito modificador da resistência

O experimento foi realizado em triplicata seguindo o protocolo e as referências citadas no tópico anterior, mas desta vez foram determinadas as CIMs dos antibióticos realizando a microdiluição destes em concentrações que variaram de 1.024 a 0 µg/mL, na presença e na ausência dos produtos na concentração subinibitória (CIM do produto/16).

2.8 Teste de Toxicidade

A investigação da atividade tóxica seguiu o método *ex vivo* de viabilidade celular em tecido hepático de *Mus musculus* pelo reagente MTT adaptado de Gasparoto (2014). Os produtos (EER e FAT) foram diluídos em 2.940µL de PBS pH 7,4 e 60 µL de etanol. A partir desta solução foram feitas diluições de 10.000, 1.000, 100, 10 e 1µg/mL em PBS. O controle foi feito com o veículo de solubilização sem a amostra. Após o preparo das soluções um camundongo (*Mus musculus*) foi anestesiado com cloridrato de cetamina 0,02 mL (i.p.) e cloridrato de xilazina 0,01 mL (i.p.). O fígado foi então retirado, colocado em placa de Petri sobre uma plataforma de gelo contendo PBS. Foram feitos cortes de pedaços do fígado com aproximadamente o mesmo tamanho ($\approx 1 \times 0,3\text{cm}$). Um pedaço foi adicionado em cada Eppendorf contendo as soluções-teste. O peso do Eppendorf foi medido em balança de precisão antes e depois da inserção do tecido. Depois de pesados os Eppendorfs foram imediatamente colocados no banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Passado esse tempo foi acrescentado 50 µL da solução de MTT a 10,5 mg/mL em cada Eppendorf e eles foram incubados por mais 20 minutos. Passados os 20 minutos foram colocados 100 µL de DMSO a 10% para paralisar a reação. Posteriormente foram pipetados 250 µL do sobrenatante de cada Eppendorf na placa de micro-poços. O branco foi feito nas mesmas condições, mas sem a adição do MTT. A toxicidade foi mensurada através do decréscimo na formação de MTT-Formazan e para tal, a absorbância deste foi medida no aparelho ELISA (Termoplate®) a 490nm. O experimento foi realizado em triplicata.

Os valores de absorbância obtidos no teste de toxicidade foram utilizados para obter uma curva de resposta em função do peso do tecido em gramas. Foi realizada uma análise de regressão não-linear utilizando o log (inibidor) x resposta (inclinação variável). A percentagem de viabilidade celular foi mensurada a partir da seguinte fórmula:

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \frac{\left(\frac{A_{am}}{M_t}\right) * 100}{A_{con}/M_t}$$

Onde,

A_{am} = Absorbância de MTT-formazan pela amostra teste (subtraído o branco).

M_t = Massa do tecido em gramas;

A_{con} = Absorbância de MTT-formazan pelo controle (subtraído o branco);

Ressalta-se que o presente procedimento experimental também foi previamente submetido para avaliação da Comissão de Experimentação e Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional do Cariri e aprovado sob o nº de protocolo 00199/2017.2.

3. Análise Estatística

Os valores obtidos nos ensaios bacterianos foram registrados em CIMs (concentrações inibitórias mínimas), sendo os valores expressos como média ± erro padrão da média e as diferenças entre as médias consideradas significativas quando $P < 0,05$ (ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey).

Para determinar a CI₅₀ no teste de toxicidade foi realizada uma análise de regressão não linear utilizando o log (inibidor) *versus* a resposta (normalizada).

A análise de todos os ensaios foi realizada através do software Graphpad Prism versão 6.0 utilizando um intervalo de 95% de confiança.

4. Resultados

4.1 Prospecção Fitoquímica e análise por CG-EM

Na tabela 2 encontram-se os resultados da prospecção fitoquímica para o EER, que rendeu 98 g, o que equivale a 12,7% de rendimento. A presença de alcaloides observada pelos reativos de Mayer e Dragendorff na FAT demonstra que a extração foi bem sucedida, com um rendimento de 22,5%.

Tabela 2: Resultado da prospecção fitoquímica no extrato etanólico (EER) e na fração de alcaloides (FAT) de *Erythroxylum revolutum*.

| Classes de metabólitos secundários | EER | FAT |
|------------------------------------|-----|-----|
| Alcalóides | +++ | +++ |
| Compostos fenólicos | - | - |
| Esteroides | ++ | - |
| Triterpenoides | - | - |
| Flavonóides | +++ | - |
| Flavononas | + | - |
| Cumarinas | - | - |
| Antraquinonas | + | - |
| Taninos | ++ | - |
| Antocianidinas | - | - |
| Chalconas | - | - |
| Leucoantocianidinas | - | - |
| Catequinas | - | - |

(-) Ausência do composto; (+) traços; (++) presença moderada e (+++) forte presença.

A FAT foi obtida como um sólido cristalino, solúvel em acetato de etila. A análise por CG-EM identificou a presença de dois alcaloides tropânicos (Figura 1).

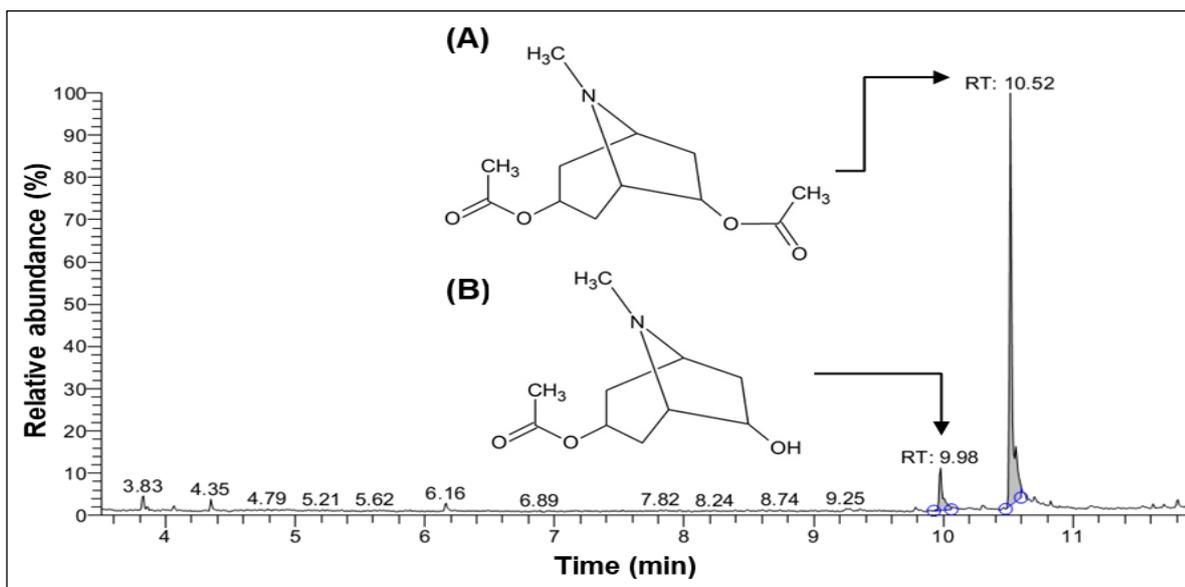


Figura 1: Cromatograma CG / EM mostrando dois picos relacionados aos dois alcaloides tropânicos identificados na fração de alcaloides das folhas de *Erythroxylum revolutum*: (A)

3,6-diacetoxytropane, com 87,77% de abundância relativa; (B) 3-acetoxi-6-hidroxi-tropano, com uma abundância relativa de 12,93%. RT: tempo de retenção.

4.2 Atividade Antibacteriana e Modificadora da resistência

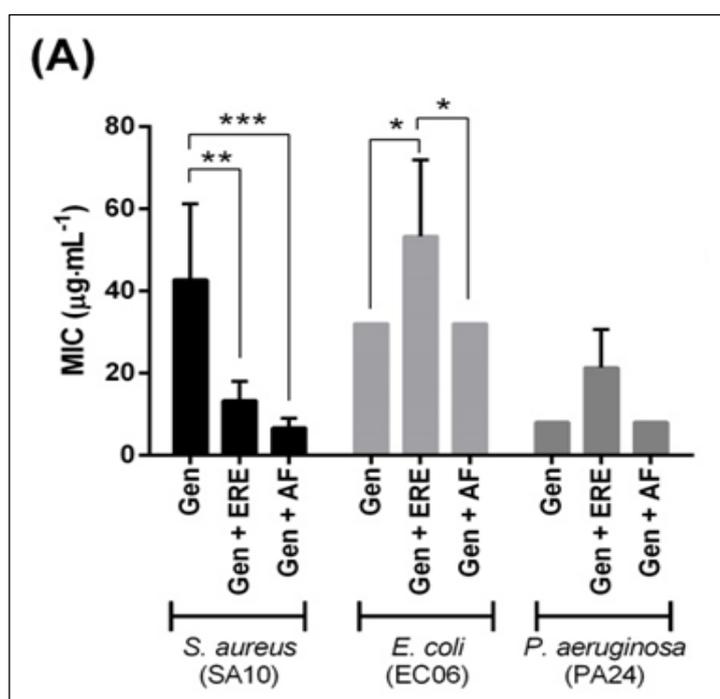
Os resultados da CIM do EER sozinho contra as cepas bacterianas não foram aplicáveis para nenhuma das cepas nas concentrações testadas, mas os resultados da CIM da FAT sozinha demonstrou efeito inibitório para *S. aureus* (Tabela 3).

Tabela 3: Atividade antibacteriana do extrato etanólico (EER) e da fração de alcaloides (FAT) de *Erythroxylum revolutum* contra cepas comuns e resistentes.

| Cepas bacterianas | EER CIM ($\mu\text{g/mL}$) | FAT CIM ($\mu\text{g/mL}$) |
|---|---------------------------------|---------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | ≥ 1024 | ≥ 1024 |
| <i>E. coli</i> 06 (EC06)* | ≥ 1024 | ≥ 1024 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | ≥ 1024 | 512 |
| <i>S. aureus</i> 10 (SA10)* | ≥ 1024 | ≥ 1024 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 | ≥ 1024 | ≥ 1024 |
| <i>P. aeruginosa</i> (PA24)* | ≥ 1024 | ≥ 1024 |

* = cepas resistentes.

Os resultados do teste de modificação da resistência estão resumidos na Figura 2.



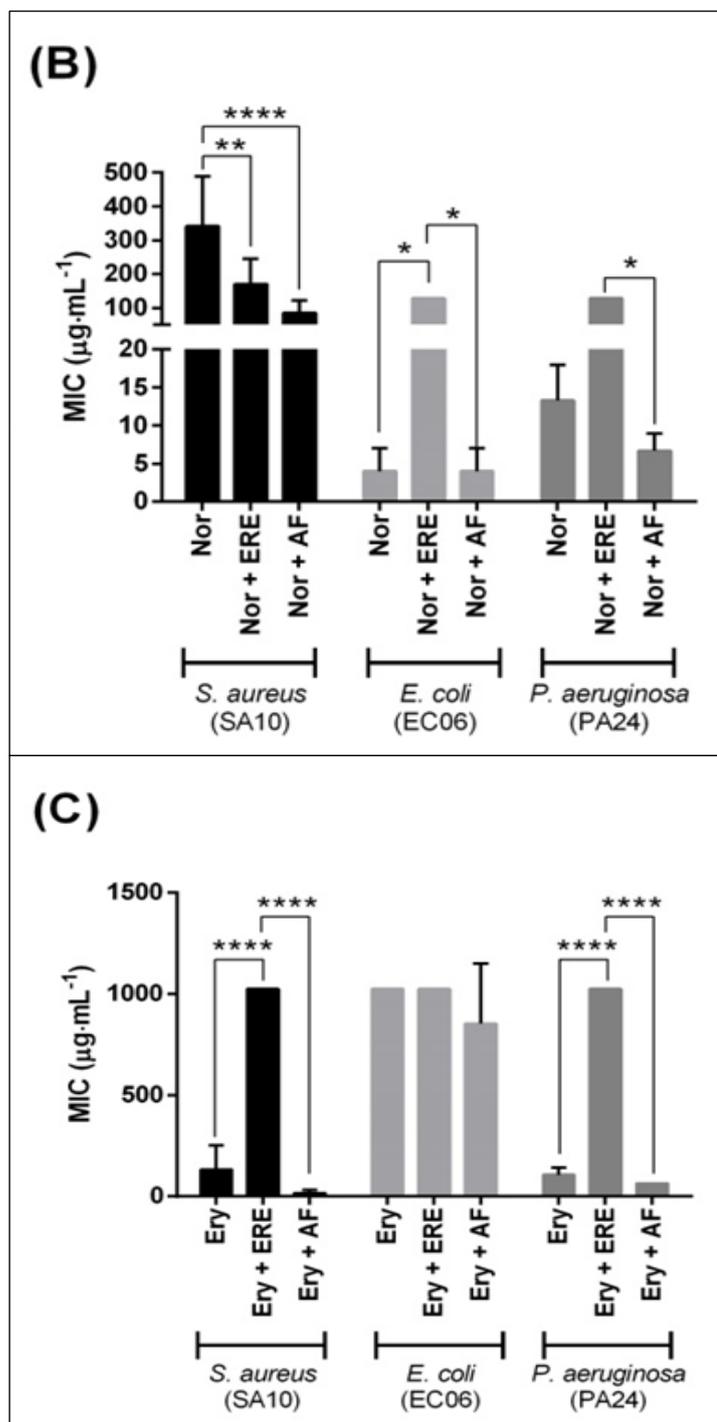


Figura 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) de antibióticos: (A) gentamicina (Gen), (B) norfloxacina (Nor) e (C) eritromicina (Ery) isolada ou combinada com o extrato etanólico bruto de *E. revolutum* (ERE) ou com a fração de alcaloides *E. revolutum* (AF). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão dos valores de CIM de três repetições (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$, ANOVA de duas vias e teste de Tukey).

Houve um sinergismo frente à *S. aureus* resistente quando os produtos foram combinados com Gentamicina. O EER no entanto agiu como antagonista frente a *E. coli* (Figura 2-A).

Na combinação do antibiótico Norfloxacin com o EER, este agiu como sinergista frente a *S. aureus* e antagonista frente à *E. coli* e à *P. aeruginosa*. Já a FAT agiu como antagonista frente a *S. aureus*, mas não apresentou efeitos contra as outras cepas (Figura 2-B).

Para a combinação com eritromicina com o EER, este agiu como antagonista contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, mas contra *E. coli* não foi significativo, enquanto a combinação com a FAT não apresentou efeitos significativos (Figura 2-C).

4.3 Toxicidade

A análise de viabilidade celular demonstrou que o EER possui baixa toxicidade com efeito dependente de concentração, com uma CI_{50} estimada em 1.139,0 $\mu\text{g/mL}$, com um intervalo de confiança entre 379,6 e 3.417,0 $\mu\text{g/mL}$, com $R^2 = 0,87$ e $\alpha = 0,05$. A FAT também apresentou baixa toxicidade, com uma CI_{50} estimada em 6.752,0 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,79$ e $\alpha = 0,05$), com um intervalo de confiança entre 3.210 e 14.203 $\mu\text{g/mL}$.

5. Discussão

5.1 Prospecção Fitoquímica

A predominância de flavonoides, alcaloides, taninos, esteroides e antraquinonas no EER, corroboram com a literatura. Segundo González-García et al. (2005), as classes predominantes neste gênero são alcaloides, flavonoides e terpenóides, mas fitoesteroides, taninos e antraquinonas, embora não sejam tão comuns, também são relatados.

Os alcaloides tropânicos encontrados na análise por CG-EM corrobora com a literatura, pois os alcaloides desta classe representam 93% dos registros para alcaloides no gênero (Barreiros et al. 2005).

5.2 Atividade antibacteriana e modificadora da resistência

No estudo de Aguiar et al. (2012) com o extrato metanólico e frações de *Erythroxylum caatingae*, tanto o extrato quanto as frações, exceto a hexânica, apresentaram atividade contra bactérias Gram-positivas mas não contra as Gram-negativas. Entre os metabólitos do extrato foram isolados alcaloides tropânicos, o que corrobora com o nosso estudo, em que a FAT apresentou inibição da bactéria gram-positiva *S. aureus*, mas não das gram-negativas.

As combinações dos produtos de *E. revolutum* com Gentamicina são eficazes contra *S. aureus* porque reduzem a dosagem terapêutica necessária. Vale ressaltar que a Gentamicina apresenta certo grau de nefrotoxicidade e ototoxicidade, comum aos antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (Oliveira et al., 2006; Rang et al., 2007) e a diminuição da dosagem terapêutica é extremamente benéfica ao paciente. Seu mecanismo de ação sobre os microorganismos age inibindo a síntese proteica. O alvo primário é a subunidade 30S dos ribossomos, o que afeta as vias de tradução de proteínas, resposta SOS e formação de ROS (espécies reativas de oxigênio). Atualmente, a gentamicina é empregada em combinação com outros antibióticos, como a Oxacilina, a Vancomicina e Cefalozina, na terapêutica de septicemias e endocardites estafilocócicas, em pacientes com implantes de cimento ortopédico e pérolas de metacrilato para a profilaxia desta infecção em procedimentos de artroplastia do joelho e quadril (Marcinko et al., 1985; Wininger et al., 1996; Eveillard et al., 2003).

Vale ressaltar que a taxa de mortalidade, bem como os prejuízos econômicos atribuídos às infecções por estas cepas de *S. aureus* multirresistentes reforçam a necessidade de estratégias de combate (Muto et al., 2003). Elas são os principais patógenos causadores de infecções em ferimentos, endocardites, pneumonias e septicemias (Lowy, 1998). A metilina, antibiótico betalactâmico, foi utilizada durante algum tempo na terapêutica destas infecções, até o surgimento e aumento em percentagem das cepas MRSA (*Staphylococcus aureus* metilina resistentes), principalmente em hospitais, tornando-se década de 70 a principal causa de infecções hospitalares no mundo (Lowy, 1998). O glicopeptídeo vancomicina passou então a ser o único antibiótico efetivo contra estas cepas, mas em meados de 1997 foram relatadas as primeiras cepas com resistência à Vancomicina e à Teicoplanina, outro glicopeptídeo. Hoje denominadas VRSA (*Staphylococcus aureus* vancomicina resistentes), elas estão aumentando em número pelo mundo inteiro (Boyle-Vavra et al., 2001; WHO, 2014).

Embora a gentamicina não seja empregada como droga de primeira escolha nestas infecções, o surgimento destas linhagens resistentes exige cada vez mais o desenvolvimento

de novas estratégias terapêuticas, nas quais a gentamicina aparece como um bom agente quando em sinergismo com antibióticos inibidores da síntese da parede celular, como os glicopeptídeos e os beta-lactâmicos, que facilitam a sua penetração (Leclercq, 1999; Mamizuka e Oliveira 2000; Boyle-Vavra et al., 2001; Gosbell, 2005; Glew e Pavu, 1983; Kotra et al., 2000).

Para tentar compreender como os componentes do extrato podem estar interagindo, é necessário compreender não apenas o mecanismo do antibiótico, mas também o mecanismo de resistência das cepas testadas.

A resistência aos antibióticos apresentada por *S. aureus* acontece por mecanismos associados às PBPs (sigla em inglês para Proteínas Ligadoras de Penicilina), enzimas que se localizam na membrana celular e catalisam a etapa final da síntese da parede bacteriana. As PBPs 1, 2 e 3 possuem alta afinidade (sítios-alvo) com os beta-lactâmicos, ligando-se covalentemente e podem ser codificadas cromossomicamente ou mediadas por plasmídeos (Chambers, 1997). A resistência a Meticilina está associada à produção de uma enzima adicional anômala, denominada PBP 2^a que é codificada pelo gene cromossômico *mecA* e possui baixa afinidade pelos beta-lactâmicos, modificações na capacidade de ligação das PBPs e à hiperprodução de beta-lactamases (Tomasz et al. 1989; Chambers, 1997). Já a resistência a vancomicina está associada a hiperprodução das PBPs 2', que promovem a produção de componentes da parede celular (mucopéptídeo). Com isto, ocorre o espessamento da parede celular e o aprisionamento da droga, reduzindo a quantidade que chega ao local de ação (Boyle-Vavra et al., 2001).

Já a resistência das Gram-negativas, como *E. coli* e *P. aeruginosa*, está associada a diversos outros mecanismos diferentes, como a bomba de efluxo, que expulsa o antibiótico, as porinas, canais de membrana que não permitem a entrada de certos antibióticos, mudanças na conformação da membrana plasmática e enzimas que alteram a estrutura do antibiótico por fosforilação, acetilação e poliadenilação (Tafur et al., 2008).

Diante do exposto, o fato do EER e da FAT apresentarem um sinergismo com gentamicina frente à bactéria Gram-positiva *S. aureus* é um fato peculiar que nos dá algumas pistas sobre este mecanismo de ação. É possível que os alcaloides tropânicos de *E. revolutum* estejam interferindo de alguma forma a atividade das PBPs, ocasionando de alguma forma a diminuição da espessura da parede e o aumento da quantidade da droga que chega ao seu local de ação. No entanto, outros estudos ainda são necessários para testar a hipótese deste mecanismo de ação.

O estudo de Aquino et al. (2016) apresentou resultados parecidos, onde a combinação de *Sideroxylon obtusifolium* e Gentamicina apresentou sigernismo frente a *S. aureus* e antagonismo frente *E. coli* e *P. aeruginosa*. O autor sugeriu que esta atividade esteja relacionada com a presença de flavonoides no extrato, visto que outros estudos como o de Tsuchiya et al. (1996) e Cushnie e Lamb (2005) demonstraram sinergismo entre flavonoides e antibióticos.

Araruna et al. (2013) também encontrou um sinergismo em estudo com *Caryocar coriaceum* com antibióticos da classe dos aminoglicosídeos. Entre os componentes estavam presentes também rutina e ácido gálico, assim como outros componentes, flavonoides como quercetina e taninos. O estudo de Hatano et al. (2005) demonstrou que alguns taninos e fenois apresentaram efeitos antibacterianos e sinérgicos com a Oxacilina contra *S. aureus* multirresistente.

Já o estudo de Chavez et al. (2002) com os alcaloides tropânicos de *Erythroxylum rotundifolium* em células cancerígenas demonstrou que estes são capazes de reverter o fenótipo de resistência e sugere que provavelmente eles interagem com a glicoproteína-P, produto do gene MDR1, responsável pelo efluxo de muitos fármacos e xenobióticos.

Os nossos dados demonstram que os alcaloides tropânicos de *E. revolutum* são capazes de reverter o mecanismo de resistência de *S. aureus*, mas não exclui a possibilidade de que outras moléculas presentes no extrato, como a rutina e o ácido gálico, também possam exercer uma atividade semelhante, apenas estudos posteriores com frações que privilegiem estas classes de moléculas podem responder a estas questões.

Por fim, as moléculas presentes no extrato podem interferir com um ou vários alvos, o que pode resultar num efeito sinérgico ou antagônico (Wagner e Ulrich-Merzenich, 2009). Os antagonismos observados em algumas combinações podem estar relacionados a uma ligação destes compostos aos alvos das drogas ou à ligação com a própria droga resultando num efeito quelante. Portanto, estudos com componentes isolados do extrato podem resultar na descoberta de uma ou mais moléculas bioativas, que através de técnicas de separação molecular pode levar ao desenvolvimento de um medicamento eficaz para o tratamento de infecções estafilocócicas multirresistentes.

5.3 Toxicidade

Os estudos de toxicidade já realizados neste gênero refletem a complexidade das suas atividades biológicas, resultado da sua diversidade em termo de espécies e de moléculas, que tornam os seus mecanismos difíceis de prever.

Muitos alcaloides tem atividade tóxica comprovada, os pirrolizidínicos, inclusive, são altamente tóxicos. O estudo de Yang et al. (2001) indica que eles são hepatotóxicos, provocando o aparecimento de tumores através de um mecanismo genotóxico que acelera as rotas metabólicas para a formação de metabólitos tóxicos. Todavia, como a maioria dos alcaloides do gênero são do tipo tropano, é pouco provável que os alcaloides que encontramos sejam desta classe. Além disso, no estudo de Aguiar et al. (2012) com *Erythroxylum caatingae* Plowman, foram testados o extrato, as frações e um alcaloide isolado e nenhum dos produtos apresentou toxicidade significativa.

Negri et al. (2016) testaram *in vivo* os extratos etanólicos das folhas e das cascas de *Erythroxylum vacciniifolium* Mart.. Os efeitos foram distintos, como a diminuição do tempo de sono, ocasionada apenas pelo extrato das folhas, e a morte do animal, ocasionada apenas pelo extrato das cascas. O autor sugere que a diferença nos sintomas apresentados se dava pela composição química destes. O das cascas (mais tóxico e letal) apresentou como principais constituintes as cinchoninaínas, enquanto o das folhas (menos tóxico) apresentou flavonoides glicosídeos.

Mahomoodally et al. (2005) observaram que o extrato de *Erythroxylum macrocarpum* O. E. Schulz causou diminuição da capacidade de absorção pelas células intestinais em concentrações de 6 e 12 mg/mL. O autor levanta a hipótese que os taninos, fenóis e alcaloides presentes no extrato diminuem a permeabilidade da membrana dos enterócitos e o transporte passivo de fluidos.

Embora nosso estudo não tenha usado enterócitos como modelo, é possível que entre os metabólitos que encontramos no EER estejam diminuindo a permeabilidade da membrana dos hepatócitos. Apesar dos indícios ainda são necessários estudos, tanto *in vitro* como *in vivo* para elucidar este mecanismo de ação e testar as dosagens seguras de uso. Isto é importante porque *E. revolutum* é utilizada por povos tradicionais do nordeste do Brasil (cachaça e chá das folhas e flores) como afrodisíaca e para tratar problemas cardíacos (Agra et al., 2008; Loiola et al., 2007). Portanto, é importante que se determine a forma de uso e as dosagens seguras deste produto natural.

6. Conclusões

O sinergismo entre os produtos de *E. revolutum* e Gentamicina demonstra que eles possuem potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos eficazes no tratamento das infecções ocasionadas por *S. aureus* multirresistente. No entanto, a FAT apresentou uma maior potencialização do efeito da Gentamicina e uma toxicidade bem menor que o EER, demonstrando o potencial dos alcaloides tropânicos de *E. revolutum* para a produção de novos antibióticos, mas ainda são necessários estudos em modelos *in vivo* para observar possíveis mecanismos bioquímicos subjacentes.

7. Referências

- Agra, M. F., Silva, K. N., Basílio, I. J.L.D., Freitas, P.F., Barbosa-Filho, J.M., 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18, 472-508.
- Aguiar S. J., Araújo, O. R., Maria, do D. R., Sena, K. X. F. R., Batista, A.M., Guerra M. M. P., Oliveira, S. L., Tavares, J. F., Silva, M. S., Nascimento, S. C., Silva, T. G., 2012. Antimicrobial, Antiproliferative and Proapoptotic Activities of Extract, Fractions and Isolated Compounds from the Stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 4124-4140.
- Albuquerque, C. H., Tavares, J. F., Oliveira, S. L., Silva, T. S., Gonçalves, G. F., Costa, V. C. O., Agra, M. F., Pessôa, H. L. F., Silva, M. S., 2014. Flavonóides Glicosilados de *Erythroxylum pulchrum* St. Hil. (Erythroxylaceae). *Química Nova* 37, 663-666.
- Aquino, P., Figueiredo, G., Pereira, N., Nascimento, E., Martin, A., Veras, H., Oliveira, C., Ferreira, S., Leandro, L., Silva, M., Menezes, I., 2016. Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória Tópica e Antibacteriana do Extrato Metanólico das Folhas de *Sideroxylon obtusifolium*. *Acta biológica Colombiana* 2, 131-140.
- Araruna, M.K.A., Santos, K.A., Costa, J. G. M., Coutinho, H. D. M., Boligon, A. A., Stefanello, S. T., Athayde, M. L., Saraiva, R. A., Rocha, J. B. T., Kerntopf, M. R., Menezes, I.

R. A., 2013. Phenolic composition and in vitro activity of the Brazilian fruit tree *Caryocar coriaceum* Wittm. *European Journal of Integrative Medicine* 5, 178–183.

Barreiros, M.L., David, J.M., Queiroz, L.P.de, David, J.P., 2005. Flavonoids and Triterpenes from Leaves of *Erythroxylum nummularia*. *Biochemical Systematics and Ecology* 33, 537-540.

Boyle-Vavra, S., Labischinski, H., Ebert, C.C., Ehlert, K., Daum, R.S., 2001. A spectrum of changes occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide-intermediate clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrobial Agents Chemother* 45, 280-287.

Chambers, H. F., 1997. Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews* 10, 781-791.

Chanda, S., Rakholiya, K., 2011. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*.

Chávez, D., Cui, B., Chai, H-B., García, R., Mejía, M., Fransworth, N. R., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M., Kinghorn, D., 2002. Reversal of multidrug resistance by tropane alkaloids from the stems of *Erythroxylum rotundifolium*. *Journal of Natural Products* 65, 606–610.

Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., 2005. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology* 101, 243-248.

Eveillard, M., Mertl, P., Tramier, B, Eb, F., 2003. Effectiveness of gentamicin-impregnated cement in the prevention of deep wound infection after primary total knee arthroplasty. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 24, 778-780.

Gasparoto, J., 2014. Avaliação do potencial antioxidante e anti-inflamatório da variedade de pêssigo Maciel (*Prunus pérsica* L. Batsh) e seus produtos liofilizados em modelo in vitro, ex vivo e in vivo. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 109 p.

Glew, R.H., Pavu, K., 1983. Stability of gentamicin, tobramycin and amikacin in combination with four β -lactam antibiotic. *Antimicrobial Agents Chemother* 24, 474-477.

González-García, K., González-Lavaut, J. A., González-Guevara, J. Prieto-González, S., 2005. Género *Erythroxyllum*: Análisis de la información científica. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 24, 284-290.

Gosbell, I. B., 2005. Diagnosis and management of catheterrelated bloodstream infections due to *Staphylococcus aureus*. *Internal Medicine Journal* 35, 45-62.

Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T. O., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T., 2005. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 66, 2047–2055.

Kotra, L. P., Haddad, J., Mobashery, S., 2000. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 3249-3256.

Leclercq, M.P., Glupczynski, Y., Tulkens, P.M., 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrobial Agents Chemother* 43, 727-737.

Levinson, W., Jawetz, E., 2002. *Medical microbiology and immunology: Examination and board review*. 7ed. Lange Medical Books/McGraw-Hill: New York.

Loiola, M. I. B., Agra, M. F., Baracho, G. S., Queiroz, R.T., 2007. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxyllaceae Kunth. *Acta botanica brasílica*. 21, 473-487.

Lowy, F.D., 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine* 339, 520-532.

Mahomoodally, M. F., Fakim, A., Subratty, A. H., 2005. Effects of *Erythroxyllum macrocarpum* (Erythroxyllaceae), an endemic medicinal plant of Mauritius, on the transport of monosaccharide, amino acid and fluid across rat everted intestinal sacs *in vitro*. *Journal of Cell and Molecular Biology* 4, 93-98.

Mamizuka, E. M., Oliveira, G. A., 2000. Isolamento de cepas de *Staphylococcus aureus* com sensibilidade reduzida a vancomicina em hospital brasileiro. *Pharma Brasil* 6, 7-8.

Marcinko, D. E., 1985. Gentamicin-impregnated PMMA beads: an introduction and review. *The Journal of Foot Surgery* 24, 116-121.

Matos, F.J.A., 2009. Introdução à Fitoquímica Experimental. 3 ed. Fortaleza: Edições UFC.

Muto, C. A., Jernigan, J. A., Ostrowsky, B. E., Richet, H. M., Jarvis, W. R., Boyce, J. M., Farr, B. M., 2003. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and Enterococcus. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 24, 362-86, 2003.

Negri, G., Almondes, J.G.S., Galvão, S.M.P., Duarte-Almeida, J.M., Cavalcanti, P.M.S., 2006. Avaliação da Composição Química e Efeitos Toxicológicos de Extratos Etanólicos de Casca e Folhas de *Erythroxylum vacciniifolium* em Modelos *in vivo*. revistaeletronicafunvic.org.

Oliveira, J.F.P., Cipullo, J.P., Burdmann, E. A., 2006. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery* 21, 444-452.

Oliveira, S. L. de, 2012. Fitoquímica de espécies de *Erythroxylum* do semiárido: isolamento e determinação estrutural de alcaloides tropânicos, flavonoides e diterpenos. **Tese (doutorado)** – Universidade Federal da Paraíba. 192p.

Patel, S. J., Saiman, L., 2010. Antibiotic resistance in neonatal intensive care unit pathogens: mechanisms, clinical impact, and prevention including antibiotic stewardship. *Clinics in Perinatology* 37, 547–563.

Prestinaci, F., Pezzotti, P., Pantosti, A., 2015. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health* 109, 309-318.

Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J., 2007. *Farmacologia*. 6 ed. São Paulo: Elsevier, 808 p.

Saraiva, R.A., Matias, E. F. F., Coutinho, H. D. M., Costa, J. G. M., Souza, H. H. F., Fernandes, C. N., Rocha, J. B. T., Menezes, I. R. A., 2011. Synergistic action between Caryocar coriaceum Wittm fixed oil with aminoglycosides in vitro. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113, 967-972.

Tabosa, I. M., Quintas-Júnior, L. J., Pamplona, F. V., Almeida, R. N., Cunha, E. V. L. da, Souza, J. C. de A., Barbosa Filho, J. M., 2000. Isolamento biomonitorado de alcaloides tóxicos de *Prosopis juliflora* (algaroba). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 9, 11-22.

Tafur, J.D., Torres, J.A., Villegas, M.V., 2008. Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. *Infectio* 12, 217-226.

Tomasz, A., Drugeon, H. B., de Lencastre, H. M., Jabes, D., McDougall, L., Bille, J., 1989. New mechanism for methicillin-resistance in *S. aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicilin-binding proteins with modified penicilin-binding capacity. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 33, 1869-1874.

Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., Iinuman, M., 1996. Comparative study on the antibacterial Activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 50, 27-34.

Vincent, J. L., 2003. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet* 361, 2068–2077.

Violante, I. M. P., Hamerski, L., Garcez, W. S., Batista, A. L., Chang, M. R., Pott, V. J., Garcez, F. R., 2012. Antimicrobial Activity of some Medicinal Plants from the Cerrado of the central-western region of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1302-1308.

Wagner, H.; Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16, 97-110.

Wet, H. de, 2011. Antibacterial activity of the five South African *Erythroxlaceae* species. African Journal of Biotechnology 10, 11511-11514.

WHO - World Health Organization, 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva, Switzerland: WHO.

Wininger, D. A.; Fass, R. J., 1996. Antibiotic-impregnated cement and beads for orthopedic infections. Antimicrobial Agents Chemotherapy 40, 2675-2679.

Yang, Y. C., Yan, J., Doerge, D. R., Chan, P. C., Fu, P. P., CHOU, M. W., 2001. Metabolic Activation of the Tumorigenic Pyrrolizidine Alkaloid, Riddelliine, Leading to DNA Adduct Formation *in Vivo*. Chemical Research in Toxicology 14, 101-109.

4.3 - Artigo científico III

Artigo científico a ser encaminhado a Revista “**Journal of Antimicrobial Chemotherapy**”.

Todas as normas de redação e citação, doravante, atendem as estabelecidas pela referida revista, exceto o idioma.

Atividade Antifúngica e Modificadora da Resistência Fúngica do extrato etanólico e da fração de alcaloides de *Erythroxyllum revolutum* Mart. (Erythroxyllaceae) em combinação com o Fluconazol

Maísa F. S. Barbosa^a, Irwin R.A. Menezes^b, Henrique D. M. Coutinho^b, Carlos A. Souza^a, Paulo H. O. Miranda^a, Janaína E. Rocha^b, Camila F. Bezerra^b, Maria S. Costa^b, Adriano N. Simões^a, Rogério A. Saraiva^{a*}

^a Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE.

^b Universidade Regional do Cariri – URCA.

Resumo

A resistência microbiana é atualmente um dos maiores problemas em saúde pública no mundo. Na tentativa de reverter este mecanismo, muitos estudos têm focado na combinação de drogas antimicrobianas com produtos naturais. Neste estudo testamos os efeitos do extrato etanólico bruto e da fração dos alcaloides totais de *E. revolutum*, sozinhos e combinados com o antifúngico fluconazol, contra espécies de *Candida* pela técnica da microdiluição em caldo. Também realizamos em ambos os produtos a caracterização fitoquímica por CLAE E CG-EM e um teste de toxicidade em tecido hepático de *Mus musculus* pelo reagente MTT. Nossos resultados demonstraram que ambos os produtos possuem atividade antifúngica. Além disso, a fração de alcaloides quando combinada com o fluconazol possui atividade modificadora da resistência de *C. krusei*, além de um efeito fungistático contra *C. albicans* e *C. tropicalis*. O teste de toxicidade *in vitro* mostrou que ambos os produtos possuem baixa hepatotoxicidade. Concluimos que a fração dos alcaloides totais de *E. revolutum* é um produto com alto potencial para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes para o tratamento de candidíases.

Palavras-chave: Biodiversidade, Alcaloides tropênicos, Modificação da Resistência Fúngica.

1. Introdução

As doenças infecciosas já chegaram a matar bilhões de pessoas ao longo da história da humanidade. A terapêutica destas infecções, entretanto, foi revolucionada com a descoberta do primeiro antibiótico por Alexander Fleming na década de 1930. No entanto, a capacidade natural que os microorganismos possuem de adquirir resistência tem deixado o cenário de saúde mundial cada vez mais crítico (Rodríguez-Roja et al., 2013; WHO, 2014). Este fato vem sendo agravado pelo uso indiscriminado e descarte indevido destas drogas. Além disso, a taxa com que isto vem acontecendo é tão alta que alguns autores chegam a mencionar um retorno à era pré-antibiótico (Baquero e Blázquez, 1997; Rodríguez-Roja et al., 2013).

Na tentativa de reverter o mecanismo de resistência destes patógenos, muitos estudos foram realizados combinando naturais com drogas convencionais, sendo inclusive o termo “Terapia Híbrida” recentemente proposto por Wagner e Efferth (2017). Bons resultados foram obtidos com esta nova abordagem, modificando a resistência de bactérias e fungos, mas os mecanismos envolvidos ainda precisam ser elucidados (Coutinho et al., 2008; Coutinho et al. 2010; Saraiva et al. 2011; Chanda e Rakholiya, 2011).

Metabólitos secundários das classes dos alcaloides, principalmente tropânicos, terpenoides e flavonoides são produzidos por espécies do gênero *Erythroxylum* (González-García et al., 2005). *Erythroxylum revolutum* é endêmica da região nordeste do Brasil, onde é conhecida como “araçá-bravo” (Loiola et al., 2007; Agra et al., 2008). Alguns estudos com extratos e/ou frações de espécies do mesmo gênero demonstraram pronunciada atividade contra microrganismos (Wet, 2011; Aguiar et al., 2012; Violante et al., 2012; Villanueva e Nakata, 2010; Albuquerque et al. 2014), mas nenhum estudo até o momento avaliou possíveis interações com extratos de espécies deste gênero e drogas antimicrobianas utilizadas no mercado.

Neste estudo, testamos as hipóteses de que o extrato etanólico e a fração de alcaloides de *E. revolutum* possuem atividade antifúngica e podem inibir e/ou modificar a resistência destes agentes infecciosos. Para isso, testamos o extrato bruto e a fração de alcaloides, sozinhos e combinados com o antifúngico fluconazol, além de realizar a caracterização fitoquímica e um ensaio de toxicidade. O objetivo é ajudar no desenvolvimento de novos medicamentos para a terapêutica destas infecções e fornecer informações importantes sobre o mecanismo de ação envolvido nesta atividade.

2. Material e Métodos

2.1 Cepas fúngicas

Foram utilizadas cepas obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Coleção de Culturas Oswaldo Cruz, *Candida albicans* (CA INCQS 40006), *Candida krusei* (CK INCQS 40095) e *Candida tropicalis* (CT INCQS 40042).

2.2 Drogas, Reagentes e Solventes

Para a extração foram utilizados: acetato de etila, ácido clorídrico, etanol 96%, sulfato de sódio anidro e hidróxido de amônio. Para o teste de microdiluição foi utilizado o antifúngico comercial fluconazol diluído em água destilada e dimetilsulfóxido (DMSO). Para o teste de toxicidade foram utilizados MTT-formazan, *Phosphate Buffered Saline* (PBS) cetamina, cloridrato de xilazina e dimetilsulfóxido (DMSO).

2.3 Material vegetal

A espécie foi identificada e uma exsicata depositada no Herbário do Semiárido Brasileiro (HESBRA) sob o nº 3711. As folhas foram coletadas em Serra Talhada-PE, Brasil (coordenadas 7° 4'29.8" S 38° 18'07.2" W) em 21/03/2017 por volta das 9:30 da manhã. As folhas foram secas em estufa a 40°C por 72 h e posteriormente trituradas.

2.4 Extração de alcaloides

O pó foi extraído com etanol 96% e concentrado em evaporador rotativo a 40°C seguindo a metodologia de Oliveira (2012). Para evaporar o solvente restante ele foi colocado em banho-maria (37 °C) e liofilizado em seguida. O extrato obtido foi submetido a uma extração ácido-base para a obtenção da Fração dos Alcaloides Totais (FAT), seguindo a metodologia adaptada de Tabosa et al. (2000). O extrato (40 g) foi diluído em etanol 96% e esta solução foi acidificada com ácido clorídrico 3% até atingir o pH 2. Em seguida, a mistura foi colocada em funil de separação com acetato de etila e água (1:1) v/v, homogeneizada e deixada descansar até se obter duas fases. A fase acetato de etila foi descartada e a aquosa foi alcalinizada com hidróxido de amônio concentrado até ela atingir o pH 9 e, em seguida, foi adicionado acetato de etila concentrado. A mistura foi homogeneizada e separada da mesma forma, mas desta vez a fase aquosa foi descartada e a fase acetato de etila foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada a vácuo, concentrada em

evaporador rotativo a 40°C e, por fim, posta em banho-maria para evaporar todo o solvente restante.

2.5 Prospecção fitoquímica e análises por CLAE e CG-EM

Para verificar a eficácia do procedimento de extração de alcaloides, realizamos testes pelos reativos de Mayer e Dragendorff na FAT adicionando 3 gotas dos reagentes em 0,5 ml da fração depois de passar pelo evaporador rotativo. Além disso, foi realizada a análise qualitativa dos componentes no extrato bruto e na FAT seguindo a metodologia de Matos (2009) com adaptações.

A análise quantitativa em alguns componentes do EER foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com o aparelho UHPLC⁺ (Thermo Scientific) equipado com uma coluna Dionex UltiMate 3000. As amostras na concentração de 5 mg/mL foram diluídas em etanol P.A. e homogeneizadas em banho ultrassônico durante 10 min. Posteriormente as amostras foram filtradas em filtro de PTFE de 0,45 µm (CROMAFIL[®]). Após a filtração, as amostras foram desgaseificadas em banho ultrassônico por 20 min. Os padrões receberam o mesmo tratamento e foram diluídos nas concentrações de 0,25; 0,2; 0,15; 0,1 e 0,05 mg/mL para a construção das curvas de calibração. Foi utilizado como sistema eluente ácido acético a 2% e metanol com gradiente de concentração 0 min/5%, 2min/25%, 10 min/40%, 20min/50% e 30min/50%.

A fração de alcaloides foi submetida a análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrofotometria de Massas (CG-EM) pelo equipamento Thermo Scientific TRACE 1300 acoplado ao ISQ quadruplo, com coluna capilar de sílica fundida DB-5 de dimensões: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. A amostra foi diluída em acetato de etila e foi utilizado Hélio como gás de arraste a uma velocidade de fluxo de 1,0 mL/min, obtendo espectros de massas e cromatogramas. O experimento CG-EM foi realizado no modo de impecto de elétrons, EI a 70 eV. A temperatura do forno foi programada a partir de 60 a 300 °C a razão de 20 °C/min (14 min). Com aquecimento iniciando-se a 60 °C por 3 min, e depois com taxa de aquecimento de 40 °C/min até 100 °C e depois 20 °C/min até 300 °C, temperatura na qual se manteve a isoterma por 2 minutos. A temperatura do injetor e detector foram, respectivamente, de 250 e 280 °C.

2.6 Ensaio antifúngicos

2.6.1 Determinação da CI₅₀

O ensaio seguiu a metodologia de Moraes-Braga et al. (2016). Uma suspensão fúngica foi preparada seguindo a escala de McFarland até atingir a concentração de 10⁵ UCF/ml. A suspensão foi adicionada com o meio Caldo Saboraud Dextrose (CSD) em placas de 96 poços. A partir de uma solução-mãe (preparada com 0,15 g dos produtos, extrato bruto e fração de alcaloides, diluídos em 1 ml de DMSO e água destilada até atingir uma concentração de 16.384 µg/ml) foi realizada a microdiluição, variando a concentração dos produtos de 8.192 a 8 µg/ml. O controle negativo foi realizado com o meio de cultura e a suspensão fúngica (sem a adição dos produtos) e o controle de esterilidade apenas com o meio de cultura sozinho. O branco (para leitura da absorbância) foi realizado com o mesmo tratamento das amostras, mas sem as leveduras. O experimento foi realizado em triplicata e as placas incubadas em estufa (37°C). Após 24 h a absorbância dos poços foi medida no aparelho ELISA (Termoplate®) a 630nm para a construção da curva de crescimento, utilizando a fórmula seguinte:

$$\text{Crescimento (\%)} = \left(\frac{A_{am}}{A_{con}} \right) * 100$$

Onde,

A_{am} = Absorbância do poço contendo a amostra (subtraído o branco);

A_{con} = Absorbância do controle (subtraído o branco).

2.6.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após a leitura da CI₅₀, a CFM foi realizada seguindo a metodologia de Alves et al. (2013). Com o auxílio de uma haste estéril, uma alíquota de cada poço foi subclavada em placa de Petri com meio ASD e incubada em estufa a 37°C. Após 24 h foi realizada a leitura onde a CFM foi determinada como a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento visível da colônia fúngica.

2.6.3 Modificação da resistência

Seguindo a mesma metodologia citada no tópico anterior, foram avaliadas a CI_{50} e a CFM da droga de referência, na presença e ausência dos produtos na concentração subinibitória (CFM/16). A microdiluição foi realizada em placas de 96 poços utilizando o antifúngico fluconazol em concentrações de 8 a 8.182 $\mu\text{g/mL}$, com cada poço contendo a suspensão fúngica, o meio de cultura e o produto na concentração subinibitória. O ensaio foi realizado em triplicata, o controle de esterilidade feito com o meio de cultura sozinho e o controle negativo feito com o meio e a suspensão fúngica. A incubação e a determinação da CI_{50} e da CFM foram realizadas da mesma forma descrita no tópico anterior.

2.7 Teste de Toxicidade

Utilizando como modelo *ex vivo* tecido hepático de camundongo (*Mus musculus*), metodologia adaptada de Gasparoto (2014), a CI_{50} foi determinada pela análise da curva de viabilidade celular. O camundongo foi anestesiado com cetamina (0,02 mL) e cloridrato de xilazina (0,01 mL) (i.p.), seu fígado foi retirado e cortado em fatias com aproximadamente 1 x 0,3cm. As fatias foram colocadas em Eppendorfs contendo PBS 7,4 e os produtos em concentrações que variaram de 1 a 10.000 $\mu\text{g/mL}$. Eles foram pesados antes e depois da adição dos tecidos para mensurar a massa de cada fatia e incubados logo em seguida em banho-maria por 30 min (37 °C). Após a incubação foi adicionado MTT a 10,5 mg/mL (Sigma Aldrich) e os Eppendorfs foram incubados por mais 20 min. Por fim, foi adicionado DMSO a 10% para paralisar as reações. Uma alíquota do líquido sobrenatante das amostras foi então inserida em placa de 96 poços para a leitura da absorbância a 490 nm em aparelho ELISA, sendo o branco feito nas mesmas condições, mas sem a adição do MTT e o controle negativo sem a adição do produto. Os valores de absorbância obtidos foram utilizados para a obtenção de uma curva de viabilidade celular, analisada em função da massa do tecido a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\left(\frac{A_{am}}{M_t}\right) * 100}{A_{con}/M_t}$$

Onde,

A_{am} = Absorbância de MTT-formazan pela amostra teste (subtraído o branco);

M_t = Massa do tecido em gramas;

A_{con} = Absorbância de MTT-formazan pelo controle (subtraído o branco).

Ressalta-se que o presente procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Experimentação e Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional do Cariri sob o nº de protocolo 00199/2017.2.

3. Análise Estatística

Os dados dos ensaios fúngicos foram tratados através de ANOVA de duas vias (em função do tratamento e concentração) seguida de Tukey. Para determinar a CI_{50} tanto dos ensaios fúngicos quanto do teste de toxicidade, foi realizada uma análise de regressão não-linear utilizando o log do inibidor x a resposta normalizada. As análises de todos os ensaios utilizaram um $\alpha = 0,05$ e foram realizadas através do software Graphpad Prism versão 6.0.

4. Resultados

4.1 Fitoquímica

Na Tabela 1 encontram-se os resultados da prospecção fitoquímica para o extrato bruto e a FAT. A fração rendeu 9 g, equivalente a um rendimento de 22,5 %.

Tabela 1: Resultado da prospecção fitoquímica no EB (Extrato Bruto de *Erythroxylum revolutum*) e na FAT (Fração dos Alcaloides Totais).

| Classes de metabólitos secundários | EB | FAT |
|------------------------------------|-----|-----|
| Alcalóides | +++ | +++ |
| Compostos fenólicos | - | - |
| Esteroides | ++ | - |
| Triterpenoides | - | - |
| Flavonóides | +++ | - |
| Flavononas | + | - |
| Cumarinas | - | - |
| Antraquinonas | + | - |
| Taninos | ++ | - |
| Antocianidinas | - | - |
| Chalconas | - | - |
| Leucoantocianidinas | - | - |
| Catequinas | - | - |

(-) Ausência do composto; (+) presença fraca; (++) presença moderada e (+++) forte presença.

A análise por CLAE demonstrou a presença do flavonóide rutina (Figura 1) e ácido gálico (Figura 2), cujas concentrações encontram-se na Tabela 2. Também analisamos quanto à presença de quercetina e o resultado foi negativo.

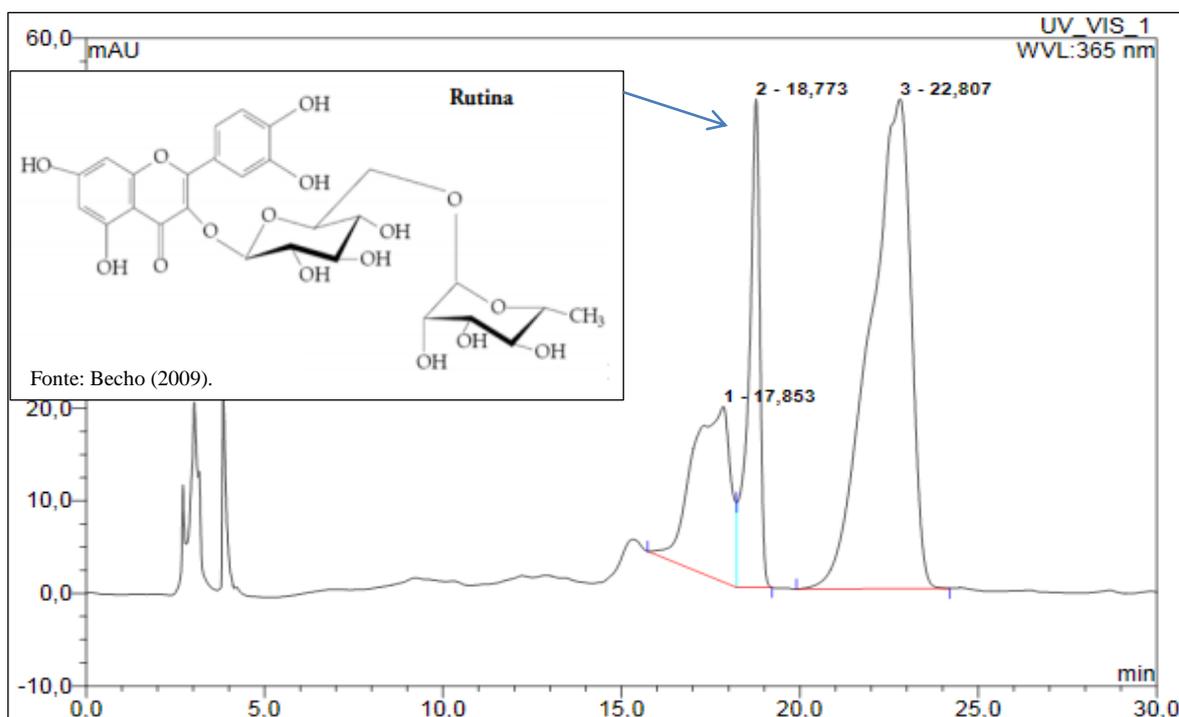


Figura 1: Cromatograma do EER (Extrato de *Erythroxylum revolutum*) apresentando com fator de retenção semelhante ao padrão de rutina (créditos na imagem).

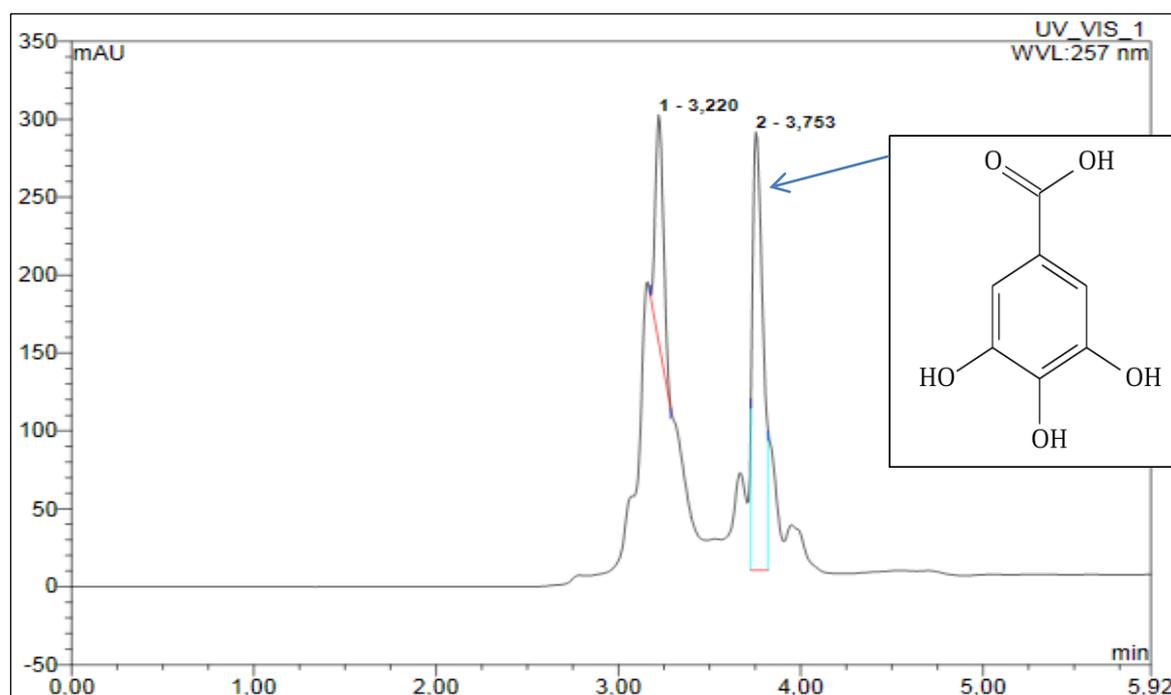


Figura 2: Cromatograma do EER (Extrato de *Erythroxylum revolutum*) apresentando pico com fator de retenção semelhante ao padrão de ácido gálico.

Tabela 2: Quantificação de ácido gálico e rutina no EER através da análise por CLAE.

| Molécula | t_R (min) | Proporção em massa (peo/peso) (mg/g) | Equação da curva de calibração |
|--------------|-------------------|--------------------------------------|--|
| Ácido gálico | $3,397 \pm 0,306$ | $19,47 \pm 5,021$ | $y = 0,0004x + 0,0062$; $R^2 = 0,995$ |
| Rutina | $18,69 \pm 0,259$ | $14,81 \pm 0,4207$ | $y = 0,0014x - 0,0014$; $R^2 = 0,999$ |

Legenda: t_R = tempo de retenção médio do padrão.

A FAT foi obtida como um sólido cristalino, solúvel em acetato de etila. A análise por CG-EM identificou a presença de dois alcaloides tropânicos (Figura 3).

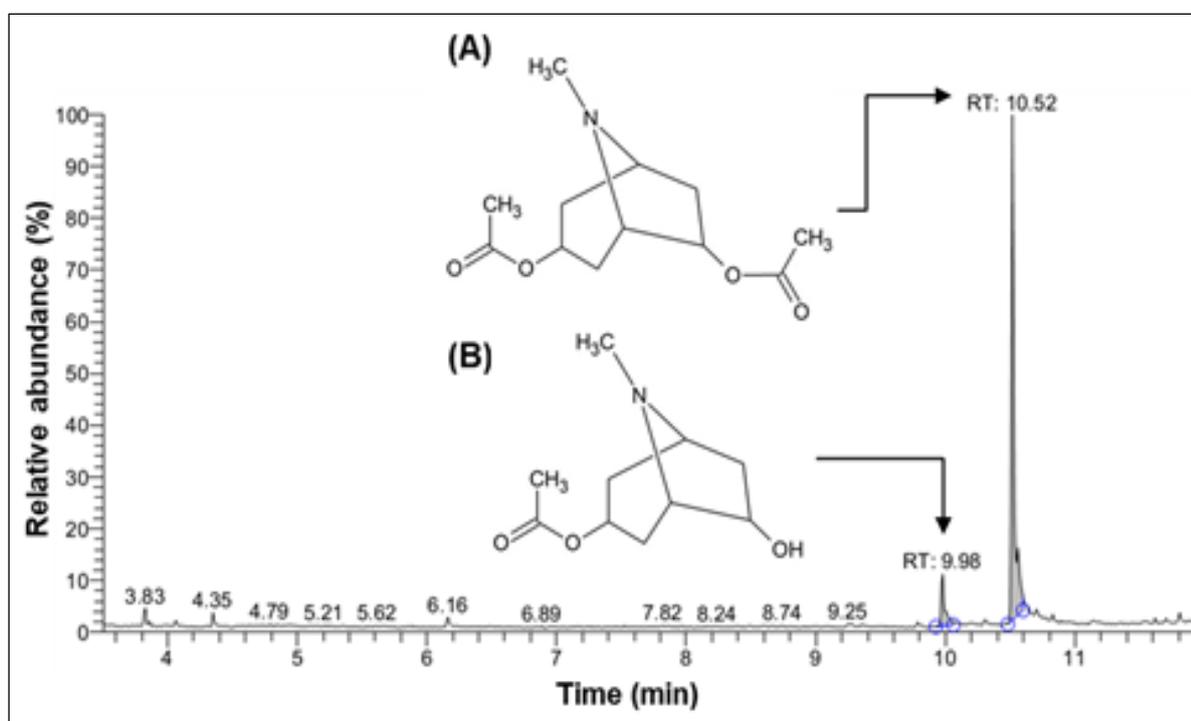


Figura 3: Cromatograma CG / EM mostrando dois picos relacionados aos dois alcaloides tropânicos identificados na fração de alcaloides das folhas de *Erythroxylum revolutum*: (A) 3,6-diacetoxytropane, com 87,77% de abundância relativa; (B) 3-acetoxi-6-hidroxi-tropano, com uma abundância relativa de 12,93%. RT: tempo de retenção.

4.2 Atividade Antifúngica

As análises de regressão das curvas de crescimento demonstram que ambos os produtos possuem atividade antifúngica dependente de concentração (Figura 4).

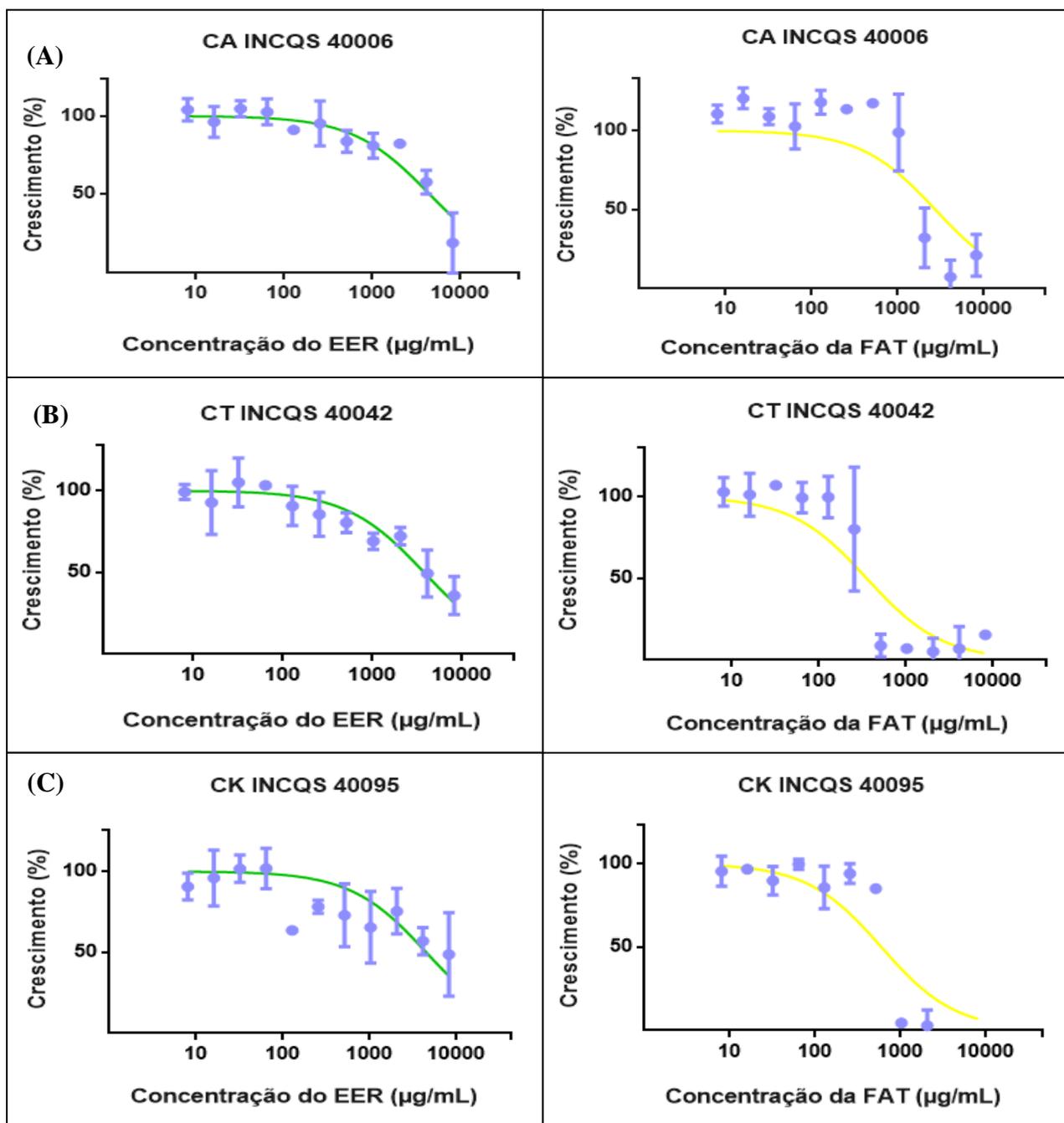


Figura 4: Curvas de crescimento de espécies de *Candida* na presença do EER (extrato etanólico de *Erytroxylum revolutum*) e da FAT (fração dos alcaloides totais). (A) Ensaio com *C. albicans* (EER: CI₅₀ = 4.417 e R² = 0,81; FAT: CI₅₀ = 2.735 e R² = 0,68) . (B) Ensaio com *C. tropicalis* (EER: CI₅₀ = 3.764 e R² = 0,77; FAT . CI₅₀ = 353 e R² = 0,82). (C) Ensaio com *C. krusei* (EER: CI₅₀ = 2.954,0 e R² = 0,77; FAT: CI₅₀ = 595 e R² = 0,81).

A CFM demonstrou que para o EER estes efeitos eram apenas fungistáticos porque as colônias voltaram a crescer. A CFM da FAT, no entanto, demonstrou que ela é fungicida contra *C. krusei* (Tabela 3), enquanto para as outras espécies de *Candida* ela apresenta apenas efeito fungistático.

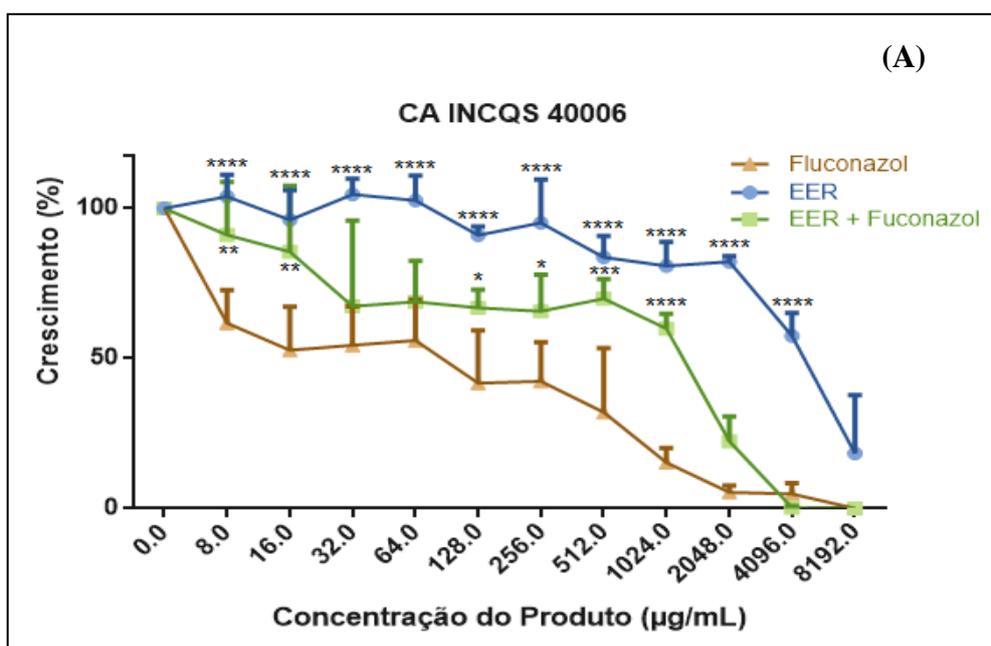
Tabela 3: Resultado da CFM (Concentração Fungicida Mínima) do EER (Extrato Etanólico de

| Cepas | EER ($\mu\text{g/mL}$) | FAT ($\mu\text{g/mL}$) |
|--|--------------------------|--------------------------|
| <i>Candida albicans</i> (CA INCQS 40006) | ≥ 16.384 | ≥ 16.384 |
| <i>Candida krusei</i> (CK INCQS 40095) | ≥ 16.384 | 4.096 |
| <i>Candida tropicalis</i> (CT INCQS 40042) | ≥ 16.384 | ≥ 16.384 |

Erythroxylum revolutum) e da FAT (Fração dos Alcaloides Totais).

4.3 Atividade Modificadora da Resistência

A ANOVA de duas vias demonstrou que nos ensaios de modificação da resistência, o EER agiu como antagonista ao fluconazol (Figura 5) enquanto a FAT apresentou sinergismo (Figura 6).



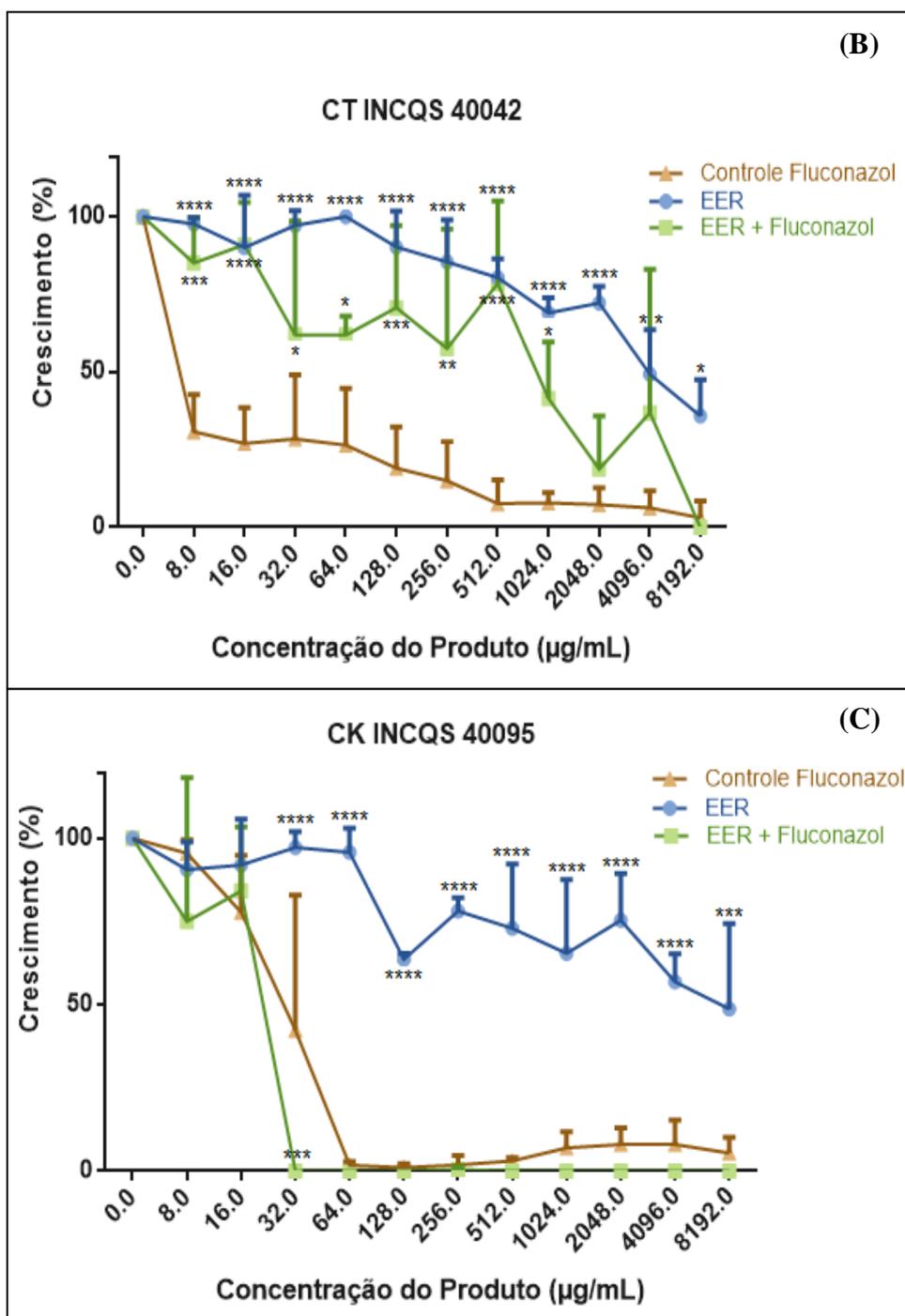
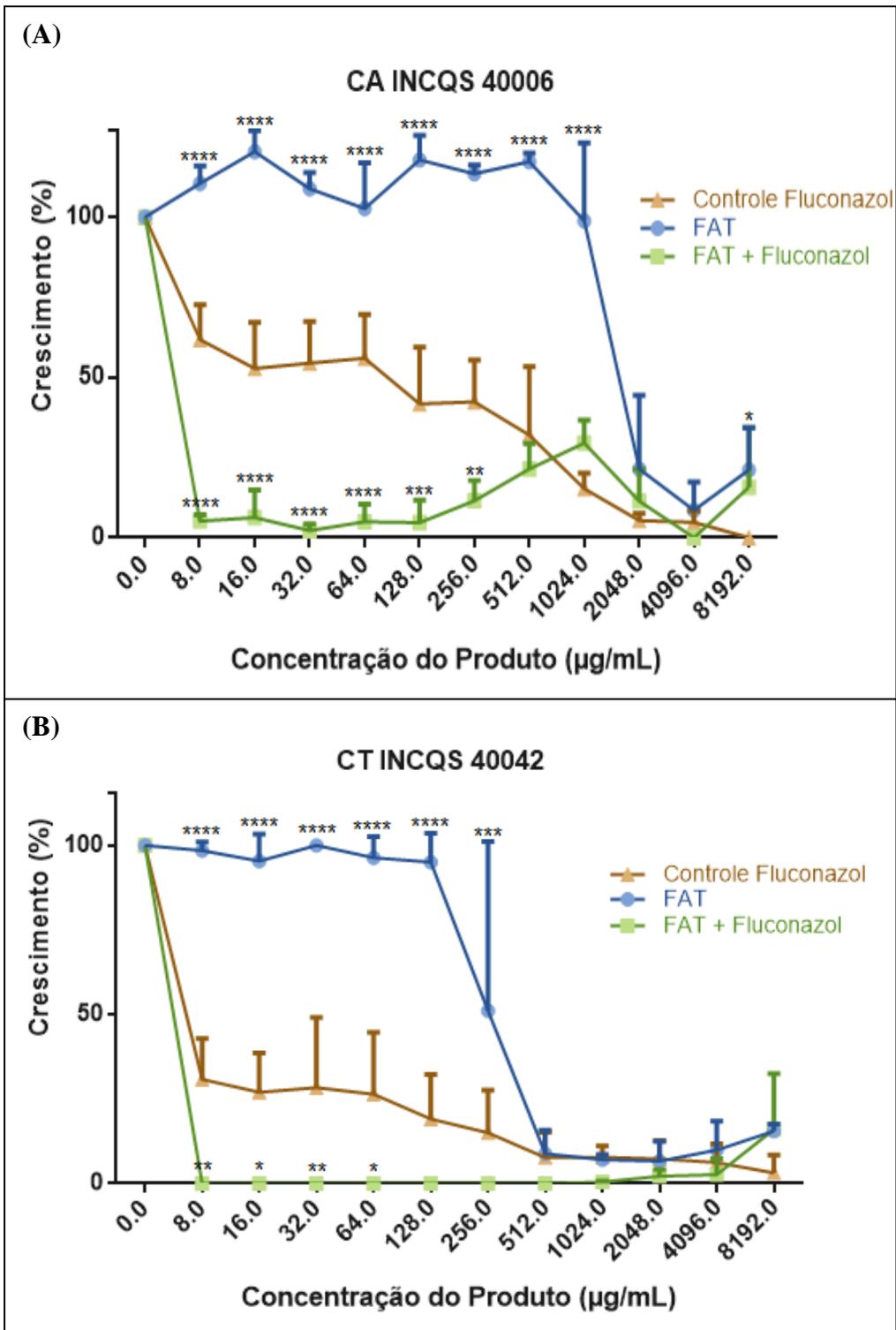


Figura 5: Efeitos do EER (extrato etanólico de *Erythroxylum revolutum*) sozinho e em combinação com o fluconazol contra o crescimento de *Candida albicans* (A), *Candida tropicalis* (B) e *Candida krusei* (C). * = p valor < 0,05; ** = p valor < 0,01; *** = p valor < 0,001 e **** = p valor < 0,0001 significativamente diferente em relação ao controle de fluconazol para ANOVA seguida de Tukey.



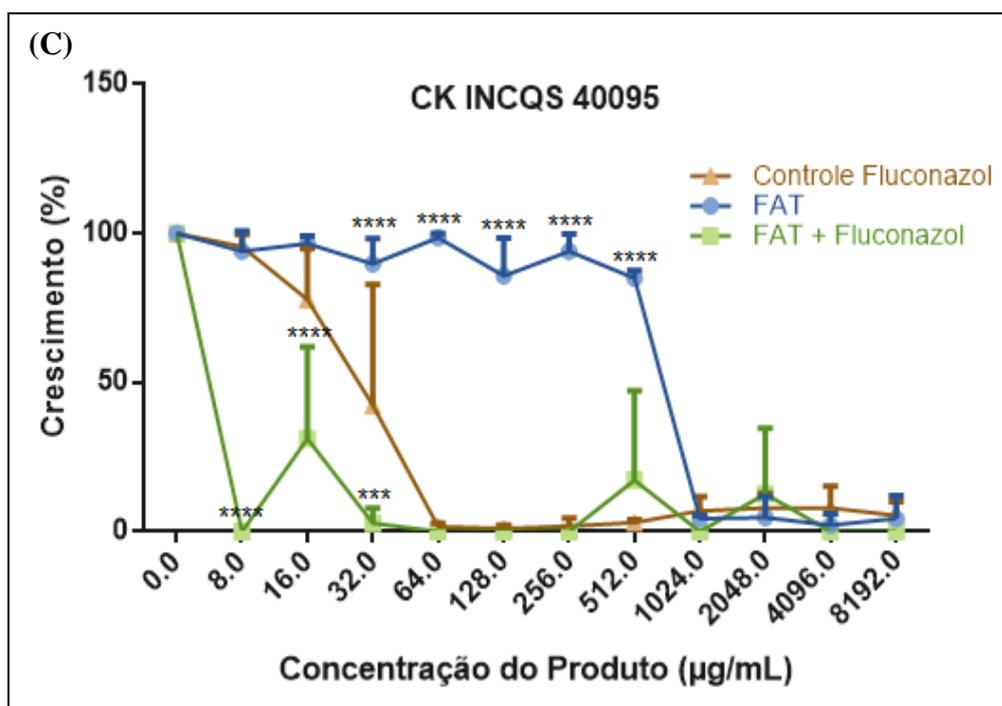


Figura 6: Efeitos da FAT (fração dos alcaloides totais) de *Erythroxylum revolutum* sozinha e em combinação com o fluconazol contra o crescimento de *Candida albicans* (A), *Candida tropicalis* (B) e *Candida krusei* (C). * = p valor < 0,05; ** = p valor < 0,01; *** = p valor < 0,001 e **** = p valor < 0,0001 significativamente diferente em relação ao controle de fluconazol para ANOVA seguida de Tukey.

Embora a combinação FAT + fluconazol tenha demonstrado uma ação fungistática contra todas as espécies de *Candida* testadas, ela só possui efeito fungicida contra *Candida krusei* (Tabela 4).

Tabela 4: Resultado da CFM da modificação da resistência fúngica pelo EER (extrato etanólico bruto de *Erythroxylum revolutum* e pela FAT (fração dos alcaloides totais) em combinação com o fluconazol.

| Cepas | CFM Fluconazol (µg/mL) | |
|--|------------------------|----------|
| | +EER | +FAT |
| <i>Candida albicans</i> (CA INCQS 40006) | ≥ 16.384 | ≥ 16.384 |
| <i>Candida krusei</i> (CK INCQS 40095) | ≥ 16.384 | 8 |
| <i>Candida tropicalis</i> (CT INCQS 40042) | ≥ 16.384 | ≥ 16.384 |

4.4 Toxicidade

A análise de viabilidade celular demonstrou que ambos os produtos possuem baixa toxicidade, com efeito dependente de concentração (Figura 7).

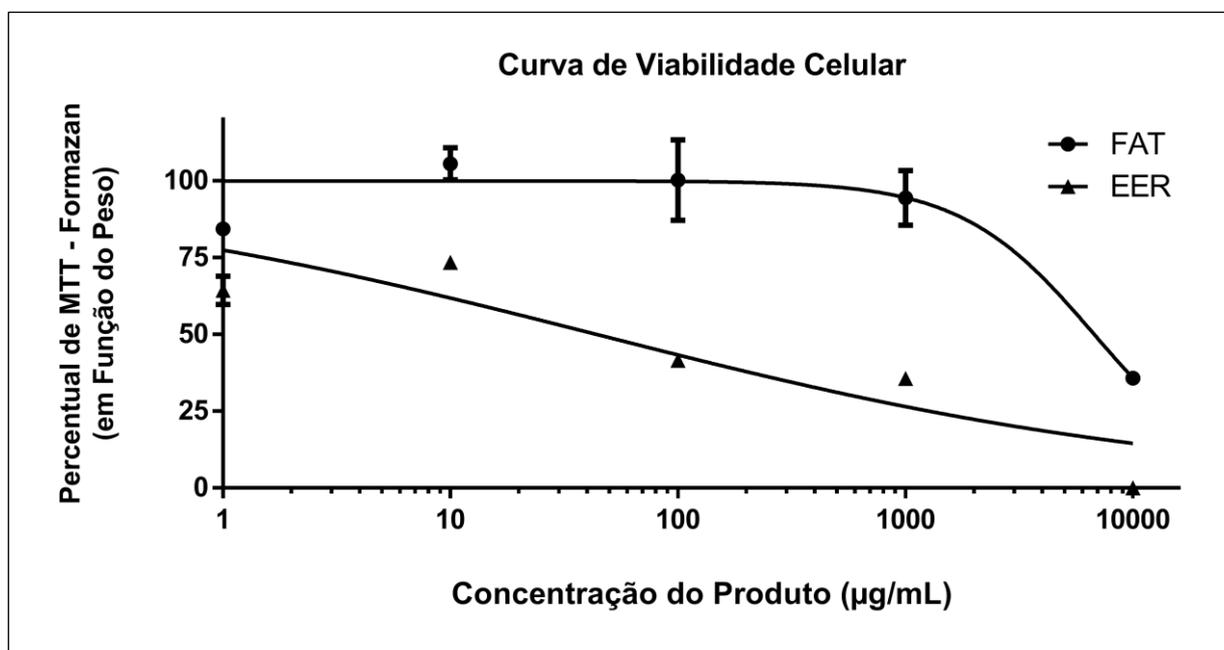


Figura 7: Efeitos do EER (extrato etanólico) e da FAT (fração dos alcaloides totais) de *Erythroxylum revolutum* em tecido hepático de *Mus musculus* pelo ensaio *ex vivo* utilizando o reagente MTT. Resultados da FAT: $IC_{50} = 6.752,0 \mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,79$ e $\alpha = 0,05$). Resultados do EER: $IC_{50} = 1.139,0 \mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,87$ e $\alpha = 0,05$).

5. Discussão

5.1 Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica qualitativa demonstrou que o processo de extração da FAT foi eficaz. O rendimento de 9 g da FAT (22,5%) é um bom rendimento. A extração ácido-base de Pereira (2017), por exemplo, obteve um rendimento muito inferior. A partir dos extratos hidroalcoolicos da folha e da casca *Erythroxylum pungens*, foi obtida uma fração enriquecida de alcaloides com rendimento de apenas 0,06% para o das folhas e 0,09% para o da raiz.

Nas espécies de *Erythroxylum* que ocorrem no Nordeste do Brasil, a presença de flavonoides inclusive é uma característica marcante (Chávez et al., 1996; Barreiros et al.,

2002). A presença de rutina inclusive já foi relatada em outros estudos fitoquímicos neste gênero (Guldbrandsen et al., 2015; Negri et al., 2016).

Segundo Inigo e Pomilio (1985), a presença de flavonoides nesta família inclusive está restrita a *Erythroxylum*, sendo quercetina e campferol, bem como seus derivados glicosídeos, marcadores quimiotaxonômicos para o gênero. Apesar de não termos encontrado quercetina em nossas amostras, não significa que ela esteja ausente, é possível que ela esteja agarrada a outros grupos e tenha apresentado um fator de retenção maior ou o método de extração não tenha sido apropriado para o arraste desta.

Os alcaloides que encontramos na análise de CG-EM corroboram com a literatura, pois os alcaloides tropânicos representam 93% dos registros para alcaloides no gênero (Barreiros et al. 2005).

5.2 Atividade Antimicrobiana e Modificadora da Resistência

Embora a atividade inibitória encontrada contra as espécies de *Candida* não tenha sido considerada aplicável clinicamente, é um indicativo de que o EER possui moléculas bioativas contra microorganismos. Muitos produtos naturais possuem atividade antifúngica, sendo a classe dos taninos a mais relatada (Augustin, 1991; Arif et al., 2009).

A atividade da FAT sozinha contra fungos corrobora com o estudo de Aguiar et al. (2012) com outra espécie do gênero, onde o extrato metanólico e frações de *Erythroxylum caatingae* demonstrou resultados parecidos, onde tanto o extrato quanto as frações, exceto a hexânica, apresentaram atividade contra fungos.

Alguns alcaloides foram testados isoladamente por Özçelik et al. (2011), assim como alguns flavonoides e compostos fenólicos, todos de origem sintética. Neste estudo, muitos alcaloides apresentaram atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* e antifúngica contra *C. albicans*, como a vincamina por exemplo (alcaloide do tipo indol). Segundo o autor, a intensidade das atividades observadas parece depender de estruturas moleculares com padrões de substituição específicos, mas que ainda carecem de estudos.

No estudo de Moraes (2011) com *Uncaria tomentosa*, o autor testou o extrato e as frações de alcaloides, polifenóis e triterpenos. Tanto o extrato bruto quanto as frações inibiram o crescimento de diferentes espécies de *Candida*. Ainda neste estudo, as frações polifenólica e triterpênica foram testadas em sinergismo com o fluconazol e apresentaram efeitos significativos, mas o sinergismo com a fração de alcaloides não foi testado.

A atividade antimicrobiana observada contra *C. krusei*, aliada ao sinergismo com o fluconazol contra estas mesmas cepas, respectivamente, é um indício do seu mecanismo. Muitas interações entre drogas convencionais e produtos naturais vêm sendo reportadas por efeitos multi-alvo sinérgicos ou pela interação com mecanismos de resistência microbianos (Wagner e Ulrich-Merzenich, 2009).

A resistência aos antibióticos pode acontecer através do efluxo da droga por bombas de transporte ativo, genes que promovem a redução na eficiência de ligação por modificação do sítio ativo ou superexpressão de componentes da parede ou ainda, pela codificação de enzimas que hidrolisam ou destroem completamente a droga (Sheldon, 2005).

As leveduras *C. krusei* são oportunistas que apresentam naturalmente um alto nível de resistência ao fluconazol associado ao fenótipo MDR, que codifica receptores com baixa afinidade pelos antifúngicos da classe dos azóis, fato que resultou em implicações clínicas extremamente negativas, principalmente em pacientes com neoplasias hematológicas, receptores de transplantes e portadores de HIV. É importante ressaltar que a resistência primária de leveduras aos derivados azóis, especialmente o fluconazol, é um fenômeno emergente e, segundo alguns autores, o que temos atualmente é apenas uma ponta do *iceberg* (Samaranayake e Samaranayake, 1994; Pfaller et al., 2008).

Já a resistência das cepas de *S. aureus* está relacionada às PBPs, enzimas que catalisam a etapa final da síntese da parede. A resistência pode ocorrer por hiperprodução destas enzimas, causando um aumento na espessura da parede, ou pela produção de enzimas anômalas com baixa afinidade pelos antibióticos (Tomasz et al. 1989; Chambers, 1997; Boyle-Vavra et al., 2001). O fenômeno de resistência em *S. aureus* inclusive vem aumentando, sendo considerado um dos principais agentes causadores de infecções com mortes no mundo inteiro (WHO, 2014). É importante ressaltar que os alcaloides não apresentaram antagonismos com nenhuma das drogas testadas, reforçando a ideia de que são moléculas com grande potencial para novos fármacos. Todavia, são necessários mais ensaios para elucidar este mecanismo de ação.

5.3 Toxicidade

A fração não apresentou toxicidade significativa, pois ela se mostrou uma dose terapêutica muito inferior à CI₅₀. Esta baixa toxicidade pode estar relacionada à uma alteração permeabilidade da membrana. Mahomoodally et al. (2005) observaram que o extrato de *Erythroxylum macrocarpum* O. E. Schulz causou uma diminuição na absorção de

alguns componentes pelos enterócitos. Os resultados do estudo sugerem que os componentes do extrato atuam alterando a permeabilidade da membrana plasmática. Neste estudo, foram identificados no extrato a presença de alcaloides, taninos e fenóis.

6. Conclusões

A fração de alcaloides de *E. revolutum* demonstrou ser bioativa contra *C. krusei* e sua combinação com fluconazol foi capaz de modificar o mecanismo de resistência desta cepa. A baixa toxicidade encontrada aliada a ausência de antagonismos reforçam o seu potencial para a produção de novos fármacos, mas ainda são necessários estudos em modelos *in vivo* para observar possíveis mecanismos bioquímicos subjacentes.

7. Referências

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J.L.D.; FREITAS, P.F .; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n.3, p. 472-508, 2008.

AGUIAR S. J., ARAÚJO, O. R., MARIA, DO D. R., SENA, K. X. F. R., BATISTA, A.M., GUERRA M. M. P., OLIVEIRA, S. L., TAVARES, J. F., SILVA, M. S., NASCIMENTO, S. C., SILVA, T. G. Antimicrobial, Antiproliferative and Proapoptotic Activities of Extract, Fractions and Isolated Compounds from the Stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 4124-4140, 2012.

ALBUQUERQUE, C. H., TAVARESA, J. F., OLIVEIRA, S. L., SILVA, T. S., GONÇALVES, G. F., COSTA, V. C. O., AGRA, M. F., PESSÔA, H. L. F., SILVA, M. S. Flavonóides Glicosilados de *Erythroxylum pulchrum* St. Hil. (Erythroxylaceae). **Química Nova**, v. 37, n.4, 2014.

ARIF, T.; MANDAL, T.K.; DABUR, R. Natural products: antifungal agents derived from plants. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, p. 621–638, 2009.

AUGUSTIN, S. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry** v.30, p.3875–3883., 1991.

BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. Evolution of antibiotic resistance. **Tree**, v. 12, p. 482-487, 1997.

BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M.; PEREIRA, P. A. DE; GUEDES, M. L. S.; DAVID, J. P. Fatty Acid Esters of Triterpenes from *Erythroxylum passerinum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society [online]** v. 13, p. 669-673, 2002.

BARREIROS, M.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.de; DAVID, J.P. Flavonoids and Triterpenes from Leaves of *Erythroxylum nummularia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p.537-540, 2005.

BOYLE-VAVRA, S.; LABISCHINSKI, H.; EBERT, C.C.; EHLERT, K.; DAUM, R.S. A spectrum of changes occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide-intermediate clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p.280-287, 2001.

CHAMBERS, H. F. Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, p. 781-791, 1997.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances** A. Méndez-Vilas (Ed.). 2011.

CHÁVEZ, J.P.; SANTOS, I. D. DOS S.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M. Flavonoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal costae*. **Phytochemistry**, v.41, p. 941-943, 1996.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-Jr., J.P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v.54, p. 328–330, 2008.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, p. 467–471, 2010.

GASPAROTO, J. Avaliação do potencial antioxidante e anti-inflamatório da variedade de pêssego Maciel (*Prunus pérsica* L. Batsh) e seus produtos liofilizados em modelo in vitro, ex vivo e in vivo. **Dissertação** (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 109 p. 2014.

GONZÁLEZ-GARCÍA, K.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; GONZÁLEZ-GUEVARA, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S. Género *Erythroxylum*: Análisis de la información científica. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n.2, p. 284-290, 2005.

GULDBRANDSEN, N.; MIERI, M.; GUPTA, M.; SEISER, T.; WIEBE, C.; DICKHAUT, J.; REINGRUBER, R.; SORGENFREI, O.; HAMBURGER, M. Screening of Panamanian Plant Extracts for Pesticidal Properties and HPLC-Based Identification of Active Compounds. **Scientia Pharmaceutica**, v.83, p.353–367, 2015.

INIGO, R.P.A.; POMILIO, A.B. Flavonoids from *Erythroxylon Argentinum*. **Phytochemistry**, v.24, p.347-349, 1985.

LOIOLA, M. I. B.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; QUEIROZ, R.T. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n.2, p. 473-487, 2007.

MAHOMOODALLY, M.F.; FAKIM, A.; SUBRATTY, A.H. Effects of *Erythroxylum macrocarpum* (Erythroxylaceae), an endemic medicinal plant of Mauritius, on the transport of monosaccharide, amino acid and fluid across rat everted intestinal sacs *in vitro*. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 4, p. 93-98, 2005.

MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3 ed. Fortaleza: Edições UFC. 2009

MORAES, R.C. 2011. Investigação in vitro da atividade antifúngica de *Uncaria tomentosa*

(WILLD) D.C. frente a leveduras patogênicas. **TCC** da Faculdade de Farmácia Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SALES, D. L.; CARNEIRO, J. N. P.; MACHADO, A. J. T.; DOS SANTOS, A. T. L.; DE FREITAS, M. A.; MARTINS, G. M. A. B.; LEITE, N. F.; DE MATOS, Y. M. L. S.; TINTINO, S. R.; SOUZA, D. S. L.; MENEZES, I. R. A.; RIBEIRO-FILHO, J.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti - *Candida* effect in association with fluconazole. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, p. 200-207, 2016.

NEGRI, G.; ALMONDES, J.G.S.; GALVÃO, S.M.P.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; CAVALCANTI, P.M.S. Avaliação da Composição Química e Efeitos Toxicológicos de Extratos Etanólicos de Casca e Folhas de *Erythroxylum vacciniifolium* em Modelos *in vivo*. **revistaeletronicafunvic.org**. 2006.

OLIVEIRA, S. L. de. Fitoquímica de espécies de *Erythroxylum* do semiárido: isolamento e determinação estrutural de alcaloides tropânicos, flavonoides e diterpenos. 2012. 192p. **Tese (doutorado)** – Universidade Federal da Paraíba.

ÖZÇELİK, B.; KARTAL, M.; ORHAN, I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. **Pharmaceutical Biology**, v.49, p. 396–402, 2011.

PEREIRA, G.M. *Erythroxylum pungens* O. E. Schulz: proteômica total e bioprospecção de alcaloides tropânicos. **Tese** apresentada ao Programa de Doutorado em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 155p.

PFALLER, M.A. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 515-521, 2008.

RODRÍGUEZ-ROJAS, A.; RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J.; COUCE, A.; BLÁZQUEZ, J. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. **International Journal of Medical Microbiology**, v.303, p.293-297, 2013.

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 41, p. 295-310, 1994.

SARAIVA, R.A.; MATIAS, E. F. F.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SOUZA, H. H. F.; FERNANDES, C. N.; ROCHA, J. B. T.; MENEZES, I. R. A. Synergistic action between Caryocar coriaceum Wittm fixed oil with aminoglycosides in vitro. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.113, p. 967-972, 2011.

SHELDON, A.T. Antibiotic resistance: a survival strategy. **Clinical Laboratory Science**, v. 8, p.170-180, 2005.

TABOSA, I. M.; QUINTAS-JÚNIOR, L. J.; PAMPLONA, F. V.; ALMEIDA, R. N.; CUNHA, E. V. L. DA; SOUZA, J. C. DE A.; BARBOSA FILHO, J. M. Isolamento biomonitorado de alcaloides tóxicos de *Prosopis juliflora* (algaroba). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.9, p. 11-22, 2000.

TOMASZ, A.; DRUGEON, H. B.; DE LENCASTRE, H. M.; JABES, D.; MCDOUGALL, L.; BILLE, J. New mechanism for methicillin-resistance in *S. aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicilin-binding proteins with modified penicilin-binding capacity. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 33, p.1869-1874, 1989.

VILLANUEVA, V. A.; NAKATA, H. M. Plantas medicinales: Efecto antibacteriano *in vitro* de *Plantago major* L, *Erythroxylum novogranatense*, *Plowman var truxillense* y *Camellia sinensis* sobre bacterias de importância estomatológica. **Odontologia Sanmarquia**, v. 13, p. 21-25, 2010.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, p. 97-110, 2009.

WAGNER, H.; EFFERTH, T. Introduction: Novel hybrid combinations containing synthetic or antibiotic drugs with plant-derived phenolic or terpenoid compounds.

Phytomedicine, v.37, p. 1–3, 2017.

WET, H. de. Antibacterial activity of the five South African *Erythroxylaceae* species.

African Journal of Biotechnology, v. 10 (55), p. 11511-11514, 2011.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014**. Geneva, Switzerland: WHO; 2014.

5. Considerações Finais

Este estudo fornece informações importantes que podem auxiliar futuros estudos nas áreas da química medicinal, farmacologia e toxicologia. Nossos resultados indicam que a fração alcaloídica é de mais baixa toxicidade quando comparada com o extrato bruto, mas ambos os produtos podem ser utilizados na terapêutica contra microrganismos multirresistentes combinados com certos agentes antimicrobianos porque a dose terapêutica é muito inferior à CI_{50} encontrada, tanto para o extrato quanto para a fração, indicando que são dosagens seguras. São necessários, no entanto, mais estudos tanto *in vitro* como *in vivo* a fim de elucidar a estrutura química e os mecanismos de ação destes alcaloides, bem como possíveis efeitos bioquímicos subjacentes.

Estes resultados são importantes porque indicam que *E. revolutum* pode ser utilizada na terapêutica, ressaltando a importância de sua conservação. Isto resalta também a necessidade de políticas públicas que visem à conservação dos ecossistemas da Caatinga.

6. APÊNDICE – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

6.1 Protocolo de Extração do EER (Extrato de *Erythroxylum revolutum*)

- Tratamento do Material Vegetal

As folhas frescas (Figura 1-A) livres de patógenos, herbívoros e parasitas foram colocadas para secar em estufa a 40°C durante 72 h. Após a secagem as folhas foram trituradas e peneiradas até se obter o pó (Figura 1-B).



Figura 1: Material vegetal. (A) Folhas frescas. (B) Folhas secas trituradas. Fonte: A autora, 2017.

- Extração a frio

A extração a frio do pó (770,97 g) foi realizada com etanol 96% seguindo a metodologia adaptada de Oliveira (2012). O etanol foi adicionado ao material (Figura 2-A) até a completa submersão (Figura 2-B) e após 72 h o líquido foi filtrado (Figura 3-A).

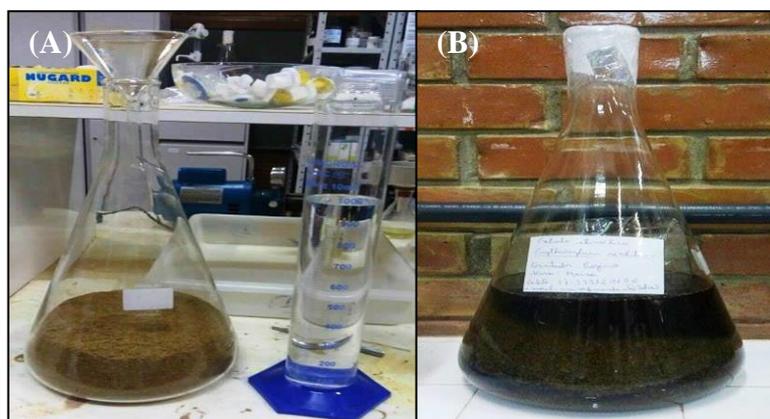


Figura 2: Extração a frio. (A) Submersão do material vegetal seco em etanol. (B) Extração por 72h. Fonte: A autora, 2017.

O processo extrativo foi realizado três vezes e, ao final, todo o líquido filtrado foi concentrado em evaporador rotativo a 40°C com pressão reduzida (Figura 3-B e C).



Figura 3: Filtração e concentração do EER (extrato de *Erythroxylum revolutum*). (A) Filtragem a vácuo. (B) Rotaevaporação com bombas de pressão reduzida. (C) Rotaevaporador ajustado para 40°C. Fonte: A autora, 2017.

Para evaporar o etanol restante o EER foi colocado em banho-maria a 40° (Figura 4) e liofilizado em seguida, rendendo 98 g do EER.



Figura 4: Concentração do EER (extrato de *Erythroxylum revolutum*) em banho-maria. (A) Ajuste do banho-maria para 40°C. (B) Monitoramento da temperatura com termômetro de mercúrio. Fonte: A autora, 2017.

6.2 Protocolo de extração da FAT (Fração dos Alcaloides Totais)

A FMA foi preparada seguindo a metodologia de extração ácido-base adaptada de Tabosa et al. (2000). Esta fração também é comumente denominada FAT (fração dos alcaloides totais), todavia, como este processo também tem a possibilidade de arrastar outras moléculas juntamente com os alcaloides, o termo FMA é mais adequado.

- Acidificação

Uma fração de 40g do EER foi diluída em 400 ml de etanol 96%. Em seguida, foi adicionado HCl 5% até a solução atingir o pH 2 (Figura 5-A). A mistura foi colocada em funil de separação com água e acetato de etila (1:1:1) v/v/v (Figura 5-B). Devido à densidade do acetato de etila ser menor que a da água, a fase aquosa mais densa fica na parte inferior. A fase acetato de etila foi descartada, pois em pH ácido os alcaloides interagem com a fase aquosa.

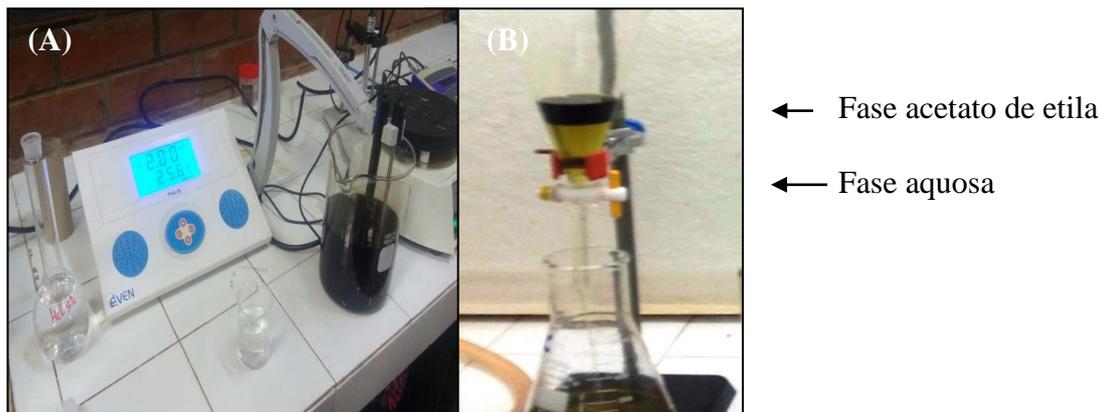


Figura 5: Extração ácida. (A) Acidificação do EER (Extrato de *Erythroxylum revolutum*) até o pH 2,0. (B) Separação em funil com acetato de etila. Fonte: A autora, 2017.

- Alcalinização

A fase aquosa obtida foi alcalinizada com hidróxido de amônio concentrado até atingir o pH 9,0 (Figura 6-A). Posteriormente, a mistura basificada foi colocada novamente em funil de separação com acetato de etila (1:1) v/v (Figura 6-B).

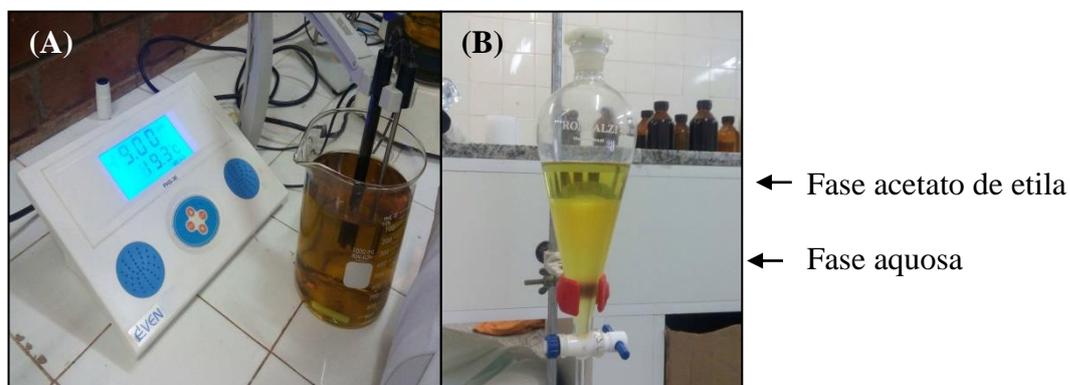


Figura 6: Extração básica. (A) Basificação da fase aquosa do EER (Extrato de *Erythroxylum revolutum*) até o pH 9,0. (B) Separação em funil com acetato de etila. Fonte: A autora, 2017.

Desta vez foi armazenada a fase acetato de etila, pois em pH básico os alcaloides interagem com a fase apolar. A fase aquosa antes de ser descartada foi colocada novamente em funil de separação com acetato de etila para mais uma extração.

- Secagem

A fase acetato de etila obtida no final do processo foi secada com 35g sulfato de sódio anidro (Figura 7) e posteriormente filtrada a vácuo.



Figura 7: Secagem da FAT: Adição de sulfato de sódio anidro. Fonte: A autora, 2017.

- Concentração

Por fim, a fração foi concentrada em rotaevaporador rotativo a 40 °C (Figura 8-A e B). Posteriormente a FAT foi colocada em banho-maria para evaporar o solvente restante (Figura 8-C).

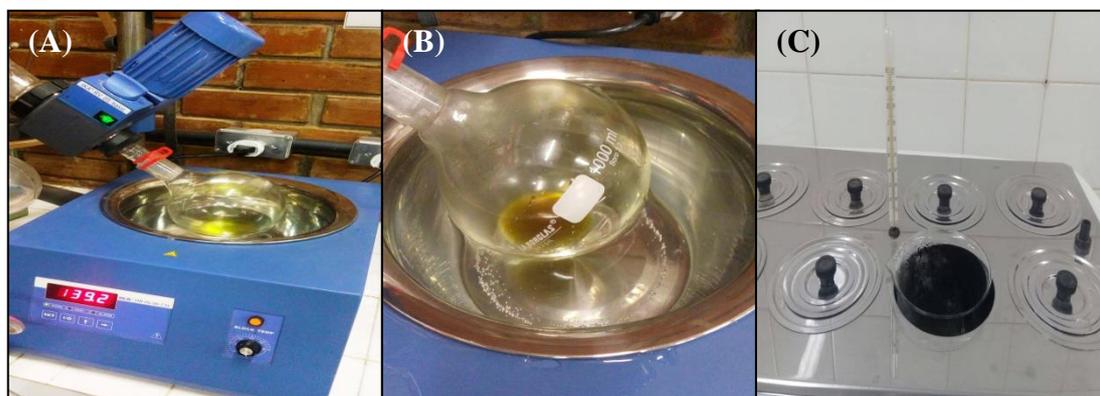


Figura 8: Concentração da FAT (Fração dos Alcaloides Totais). (A) Concentração em evaporador rotativo a 40°C. (B) FAT após o processo de rotaevaporação. (C) Retirada do solvente restante em banho-maria. Fonte: A autora, 2017.

- Esquema de Obtenção da FAT

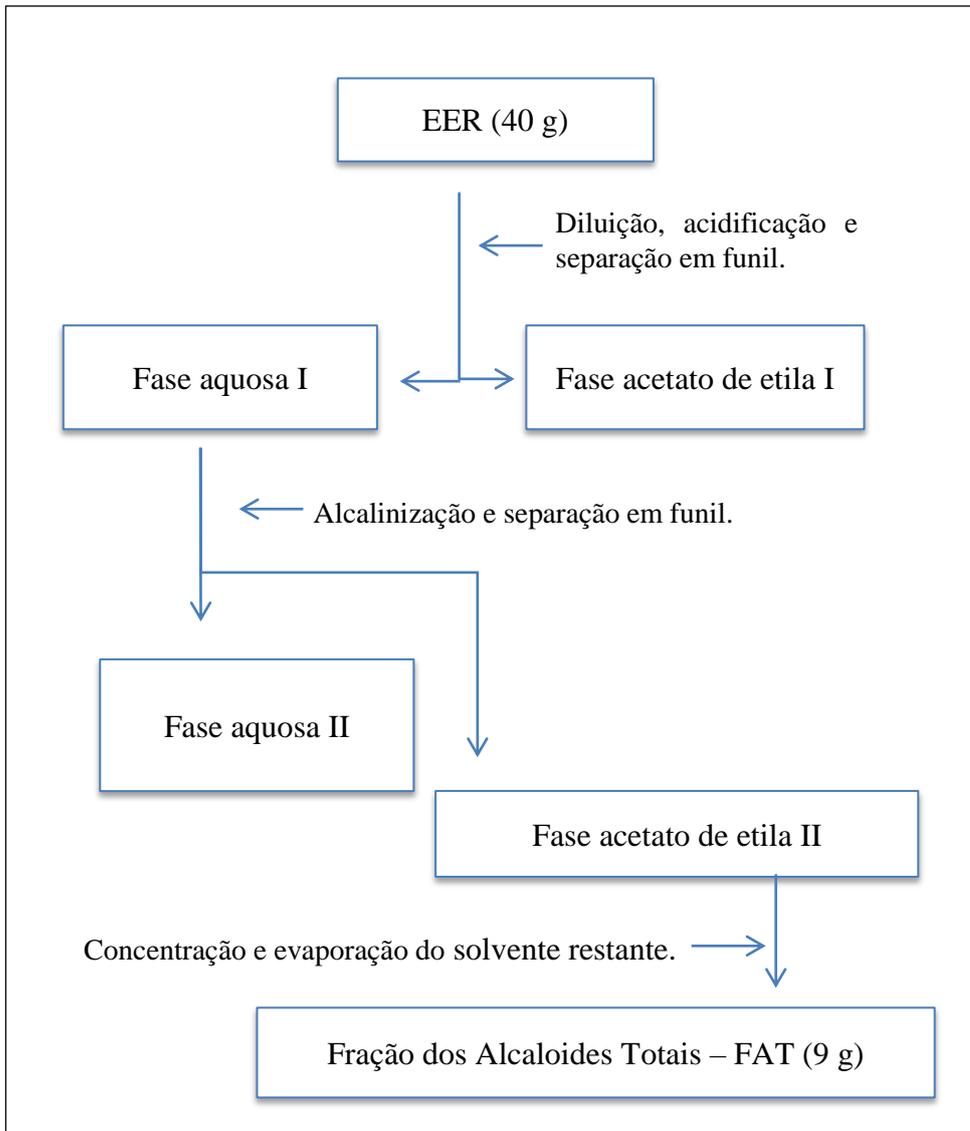


Figura 9: Partição do EER (Extrato de *Erythroxylum revolutum*) para obtenção da FAT (Fração dos Alcaloides Totais). Fonte: A autora, 2017.

6.3 Protocolo de Identificação e Quantificação de Metabólitos Secundários

A prospecção no EER e na FAT seguiu a metodologia de Matos (1997) adaptada para placas de 96 poços. Uma solução-mãe foi preparada diluindo 0,1 g dos produtos em metanol (com concentração final de 10 mg/mL) e a partir desta solução foi analisada a presença das classes de moléculas seguintes.

- Alcaloides

Foi adicionado em um poço 150µL da amostra e 50µL do reagente (o teste foi realizado para os reativos de Mayer e Dragendorff). O aparecimento de cor laranja com precipitado para o Dragendorff (Figura 10) e turvação branca para Mayer indica a presença de alcaloides.

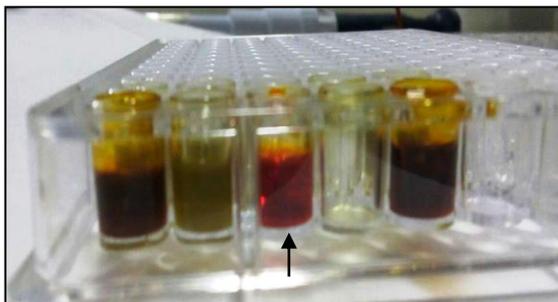


Figura 10: Resultado do teste qualitativo para alcaloides pelo reagente Dragendorff no EER (Extrato de *Erythroxylum revolutum*). Fonte: A autora, 2017.

Para testar se os alcaloides eram de fato majoritários na FAT foi realizado o teste pelo reagente Dragendorff adicionando 3 gotas do reagente a 0,5 ml da amostra depois de concentrada no rotaevaporador (Figura 11).

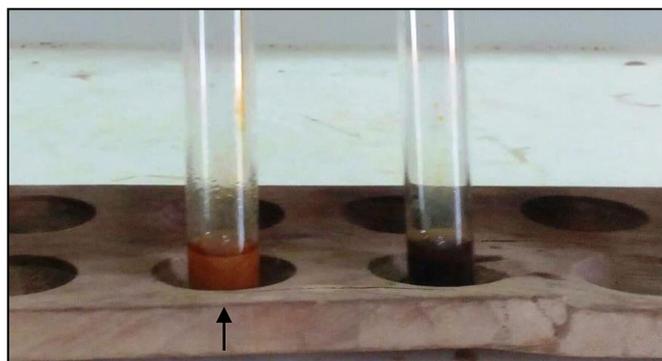


Figura 11: Resultado do teste qualitativo para alcaloides pelo reagente Dragendorff na FAT (Fração dos Alcaloides Totais). Fonte: A autora, 2017.

- Compostos fenólicos

Uma gota da amostra seguida de uma gota de FeCl₃ 2% foram adicionadas em uma tira de papel filtro. A presença dos compostos é analisada através de uma mancha azul escura.

- Flavonoides

Uma gota da amostra foi adicionada em uma tira de papel filtro, seguida de uma gota de AlCl_3 5%. O aparecimento de cor amarela na revelação em luz UV indica a presença do composto (Figura 12).

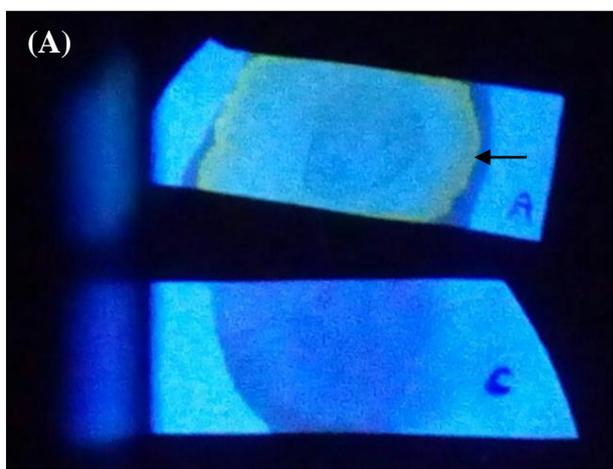


Figura 12: Resultado do teste qualitativo para flavonoides para o EER (Extrato de *Erythroxylum revolutum*). Fonte: A autora, 2017.

- Flavononas

Alguns pedaços de magnésio metálico foram colocados em um poço e em seguida foram adicionados $150\mu\text{L}$ do EER e uma gota de HCl concentrado. O teste é considerado positivo quando aparece uma tonalidade avermelhada.

- Cumarinas

Em um papel de filtro a amostra foi gotejada seguida de uma solução de KOH 10%. A leitura foi feita em luz UV 365nm e as cumarinas são detectadas através do aparecimento de cor azul.

- Antraquinonas

$150\mu\text{L}$ da amostra e $50\mu\text{L}$ de NaOH $0,5\text{ mol.L}^{-1}$ foram adicionados em um poço. O resultado é positivo quando aparece uma coloração vermelha.

- Taninos

1 ml da amostra foi adicionada a um tubo de ensaio e posteriormente gotejada gelatina a 2,5%. A presença de taninos é identificada pelo aparecimento de um precipitado branco.

- Antocianidinas e chalconas

Três tubos de ensaio receberam 1 ml da amostra. O tubo 1 foi acidificado com HCl 0,5 mol.L⁻¹ (pH 3), o 2 e o 3 foram alcalinizados com NaOH 0,5 mol.L⁻¹ (pH 8 e 11). O indicativo de antocianidinas é o aparecimento de cor vermelha, lilás e azul nos tubos 1, 2 e 3, já o de chalconas é a cor vermelha nos tubos 1 e 3.

- Leucoantocianidinas e Catequinas

Foi adicionado 1ml da amostra em um tubo de ensaio e acidificado com HCl 0,5 mol.L⁻¹ (pH 3). O tubo foi em seguida aquecido em bico de Bunsen. A presença de leucoantocianidinas é indicada a partir do aparecimento de uma coloração vermelha e a de catequinas de uma coloração amarela.

- Fitoesteroides e Triterpenoides

Foram adicionados 200 µL da amostra em um poço da placa de 96 poços com uma gota de anidro acético glacial e duas gotas de ácido sulfúrico PA. A mudança de coloração para o azul indica a presença de fitoesteroides e a mudança para o vermelho indica triterpenoides.

- Procedimento quantitativo: CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

Foram utilizados reagentes de grau analítico e todos os solventes foram de grau HPLC. A fase móvel foi filtrada com membrana de e posteriormente degaseificada. Como componente da fase móvel foram utilizados metanol (MeOH), grau de pureza HPLC, e ácido acético a 2%, preparado com água deionizada. As amostras foram diluídas em etanol P.A. e homogeneizadas em banho ultrassom durante 10 min para homogeneizar (Figura 13-A). Posteriormente foram filtradas em filtro de 0,45 µm de PTFE CROMAFIL[®] (Figura 13-B) e colocadas novamente em banho ultrassom por 20 min para degaseificar.

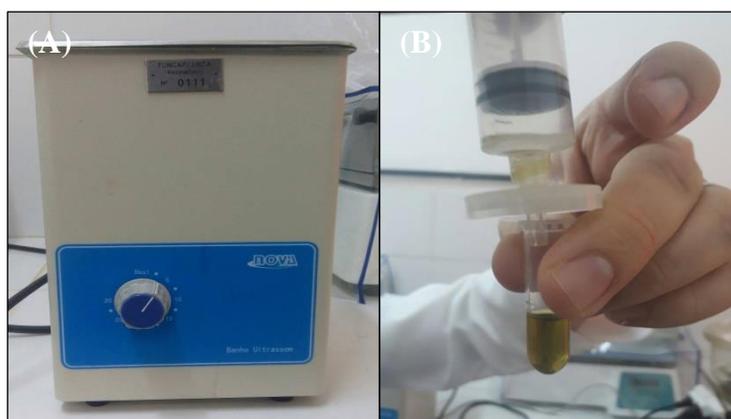


Figura 13: Preparação das amostras para CLAE. (A) Homogeneização. (B) Filtração. Fonte: A autora, 2018.

As amostras foram colocadas no aparelho de UHPLC+ (Thermo Scientific), com coluna Dionex Ultimate 3000 (Figura 14), injetor de loop 20 μ L e interface com o Software Chromeleon para aquisição e processamento dos resultados. O sistema eluente utilizado foi ácido acético a 2% e metanol P.A. com o gradiente de concentração da Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros do gradiente de concentração utilizado para o sistema eluente da CLAE.

| Retenção (min) | Fluxo (mL/min) | % MeOH | %AcOH |
|----------------|----------------|--------|-------|
| 0,0 | 0,8 | 5 | 95 |
| 2,0 | 0,8 | 25 | 75 |
| 10,0 | 0,8 | 40 | 60 |
| 20,0 | 0,8 | 50 | 50 |
| 30,0 | 0,8 | 50 | 50 |

Os padrões foram injetados antes das amostras. Eles receberam o mesmo tratamento e foram diluídos nas concentrações de 0,25; 0,2; 0,15; 0,1 e 0,05 mg/mL para a construção das curvas de calibração. O método de eluição para gradiente com coluna da fase reversa C18, com fluxo de 0,8 mL/min e faixa de comprimento de onda 365 e 257 nm.

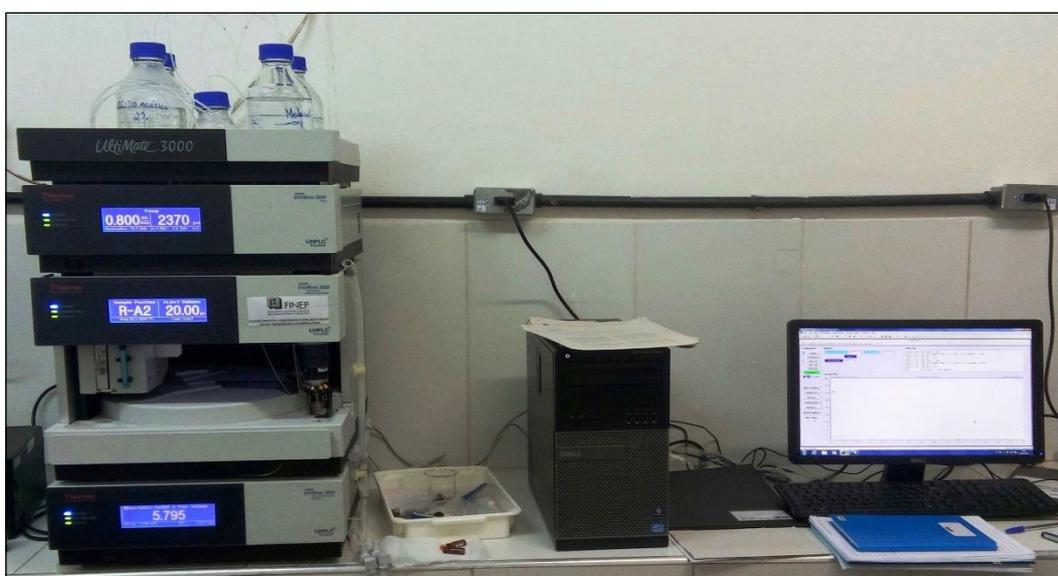


Figura 14: Aparelho utilizado para a CLAE. Fonte: A autora, 2018.

- CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas)

A FAT (fração de alcaloides) foi dissolvida em acetato de etila e analisado por um equipamento Thermo Scientific TRACE 1300 acoplado ao ISQ quadruplo GC/MS, com coluna capilar de sílica fundida DB-5 de dimensões: 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m. Foi usado hélio como gás de arraste a uma velocidade de fluxo de 1,0 mL/min, obtendo espectros de massas e cromatogramas. O experimento de GC/MS foi realizado no modo de impacto de elétrons, EI a 70 eV. A temperatura do forno foi programada a partir de 60 a 300 °C a razão de 20 °C/min (14 min). Com aquecimento iniciando-se a 60 °C por 3 min, e depois com taxa de aquecimento de 40 °C/min até 100 °C e depois 20 °C/min até 300 °C, temperatura na qual se manteve a isoterma por 2 minutos. A temperatura do injetor e detector foram, respectivamente, de 250 e 280 °C.

6.4 Protocolo do teste de toxicidade *ex vivo*

- **Preparo do Tampão Fosfato Salino ou PBS (Phosphate Buffered Saline):** O tampão de pH fisiológico (7,4) foi obtido do laboratório Sigma Aldrich. Um sachê foi diluído em 1L de água destilada em um béquer com agitador magnético. Posteriormente o pH foi conferido com um pHmetro e corrigido com HCl a 5% gotejando até a solução atingir o pH 7,4 (Figura 15-A).

- **Preparo da solução de MTT:** Foram diluídos 7,35 mg do reagente MTT em 700 μ L da solução de solubilização para conseguir uma solução a 10,5mg/mL. Tanto o MTT quanto a solução de solubilização provém do Kit para ensaios toxicológicos do laboratório Sigma Aldrich (Figura 15-B).



Figura 15: Preparação das soluções para o ensaio de toxicidade. (A) Ajuste do pH tampão fosfato salino. (B) Frascos com o reagente MTT e solução de solubilização ao centro. Fonte: A autora, 2017.

- Diluições dos produtos

Para preparar a solução-mãe 30mg de cada produto foram diluídos em 2.940 μ L de PBS e 60 μ L de etanol. A partir desta solução são feitas diluições em PBS de 10.000, 1.000, 100, 10 e 1 μ g/mL em Eppendorfs (Figura 16). O controle foi feito com 2.940 μ L de PBS e 60 μ L etanol.

- Esquema de diluição:

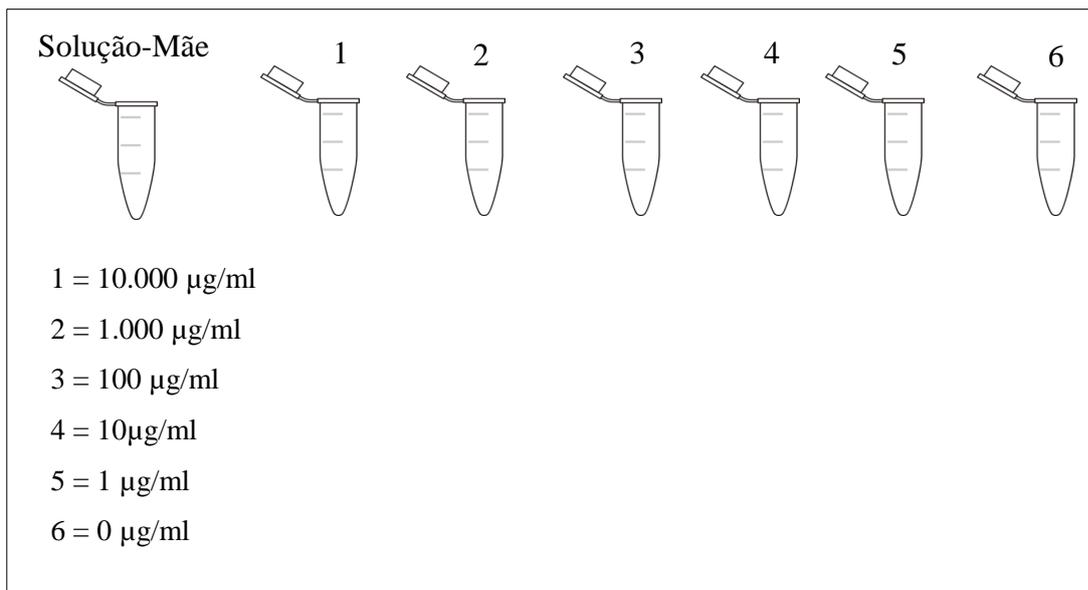


Figura 16: Esquema de diluição dos produtos utilizados no teste de toxicidade pelo reagente MTT. Fonte: A autora, 2017.

Os Eppendorfs de cada solução-teste foram pesados, antes e depois da adição dos tecidos, para mensurar a massa do tecido de cada fatia (Figura 17), necessária para calcular a toxicidade em função do peso.



Figura 17: Pesagem dos eppendorfs das soluções-teste para o ensaio de toxicidade. Fonte: A autora, 2017.

- Retirada do fígado de camundongo (*Mus musculus*)

O camundongo foi anestesiado com cloridrato de cetamina 0,02 mL (i.p.) e cloridrato de xilazina 0,01 mL (i.p.). Após a anestesia do animal foi feito um corte longitudinal no lado ventral com o auxílio de um bisturi. O fígado foi então retirado com uma pinça e colocado imediatamente em uma placa de Petri contendo o tampão sobre uma plataforma contendo gelo (Figura 18). Foram feitos cortes de pedaços do fígado com aproximadamente o mesmo tamanho (1,0 cm), uma fatia para cada Eppendorf contendo a solução-teste.



Figura 18: Fígado imerso em tampão fosfato salino sobre plataforma de gelo. Fonte: A autora, 2017.

- Incubação pré-teste

Os Eppendorfs com as soluções-teste e as fatias são colocados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos para atingir a temperatura ótima de catálise enzimática (Figura 19).



Figura 19: Incubação pré-teste das fatias com as soluções-teste em banho-maria a 37°C. Fonte: A autora, 2017.

- Adição do reagente MTT e incubação

Passado esse tempo é acrescentado 50 μ L da solução de MTT a 10,5 mg/mL em cada Eppendorf (Figura 20). Após a adição do MTT eles foram incubados por mais 20 minutos.



Figura 20: Adição de MTT nas amostras.

Fonte: A autora, 2017.

- Adição de DMSO (dimetilsulfóxido)

Passados os 20 minutos são colocados 100 μ L de DMSO a 10% em cada Eppendorf (Figura 21). Eles foram agitados para homogeneizar o DMSO, que para as reações enzimáticas naquele momento.



Figura 21: Adição de dimetilsulfóxido (DMSO) nas amostras. Fonte: A autora, 2017.

- Esquema de pipetagem

Os poços da placa foram identificados e, posteriormente, adicionados em cada poço 250 μ L do sobrenatante de cada Eppendorf (Figura 22).

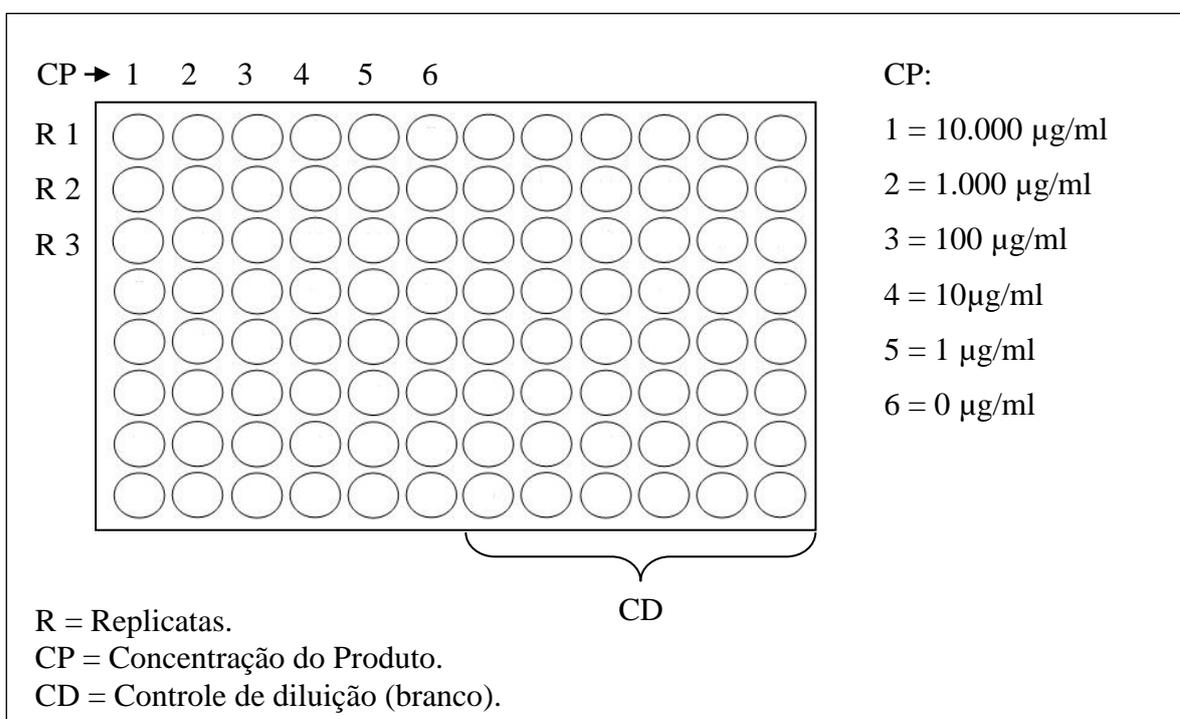


Figura 22: Esquema de pipetagem para o ensaio *ex vivo* pelo reagente MTT. Fonte: A autora, 2017.

- Leitura da absorvância

Por fim, a absorvância do produto MTT-formazan é medida no espectrofotômetro de ELISA (Termoplate®) a 490 nanômetros (Figura 23).

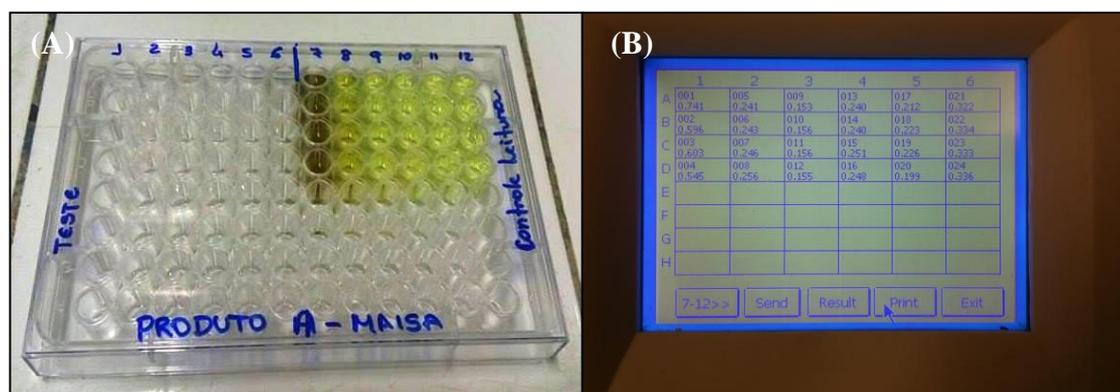


Figura 23: Leitura da absorvância no ELISA. (A) Placa de 96 poços contendo as amostras. (B) Resultado da leitura. Fonte: A autora, 2017.

PARECER – COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS
Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta
Fones: (088) 3102.1291 / Fax: (088) 3102.1291
CEP 63105-000 – Crato - CE - Brasil
propg@urca.br - www.urca.br/ceua

**DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado "BIOPROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Erythroxylum revolutum* Mart. (Erythroxylaceae)", Processo Nº 00199/2017.2, foi **APROVADO** pela Comissão de experimentação e Uso de Animais – CEUA/URCA.

Marta Regina Kerntopf

Marta Regina Kerntopf

Vice-presidente do CEUA/URCA

CRATO-CE

2017

6.5 Protocolo do Teste Antibacteriano e Modificador da Resistência

- Semeio das cepas bacterianas

Foram utilizadas cepas comuns de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e cepas multirresistentes isoladas de ambiente hospitalar de *E. coli* (EC06), *S. aureus* (SA10) e *P. aeruginosa* (PA24).

Antes do experimento, as cepas foram repicadas em meio de cultura sólido HIA (Heart Infusion Agar) e incubadas por 24 h a 37 °C (Figura 24).

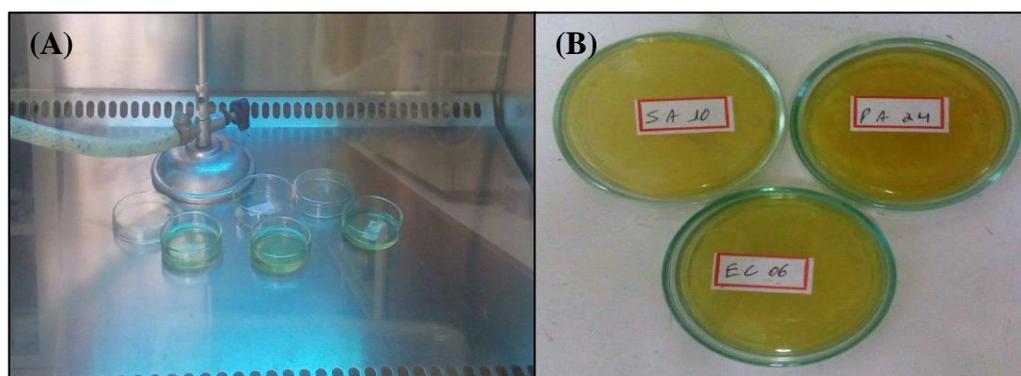


Figura 24: Semeio das cepas bacterianas. (A) Placas de Petri contendo o meio HIA. (B) Placas contendo as cepas após incubação. Fonte: A autora, 2017.

- Preparação dos Inóculos

Em tubos de ensaio com solução salina a 0,9% uma alíquota da colônia foi inoculada (Figura 25) e sua concentração foi determinada pelo padrão de turvação do tubo 0,5 da escala de McFarland, que equivale a 10^5 Unidades Formadoras de Colônias /ml. Foram preparados 3 inóculos, um para cada replicata do teste.



Figura 25: Preparação dos inóculos para os ensaios antibacterianos. (A) Retirada de uma alíquota da colônia. (B) Transferência para solução salina. (C) Análise da turbidez das células em suspensão. Fonte: A autora, 2017.

- Diluição dos Produtos

Para cada produto 0,010 g foi diluído em 1ml de DMSO (dimetilsulfóxido) e agitado no vórtex, sendo posteriormente adicionado em tubo falcon contendo 8.765 μ L de água destilada (Figura 26).

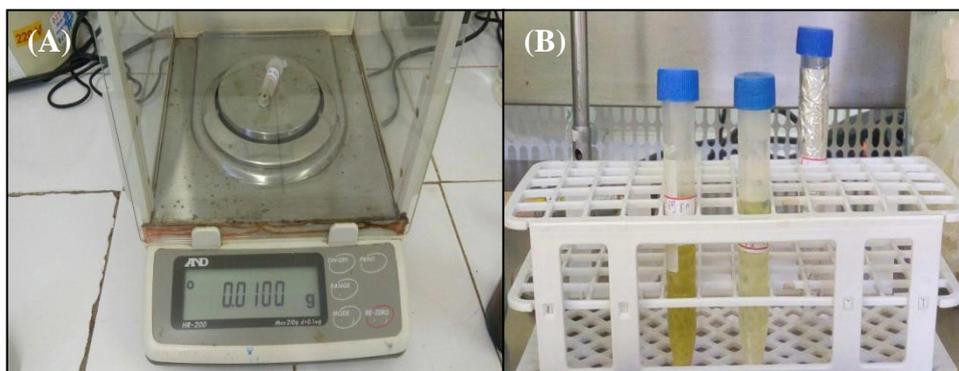


Figura 26: Diluição dos produtos para os ensaios antibacterianos. (A) Pesagem do material. (B) Tubos falcon contendo os produtos diluídos. Fonte: A autora, 2017.

- Preparação dos Eppendorfs

Antes de iniciar a microdiluição foram colocados em Eppendorffs 1.350 μ L do meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI) e 150 μ L dos inóculos bacterianos (Figura 27). O controle esterilidade recebeu apenas 1.500 μ L do meio de cultura.

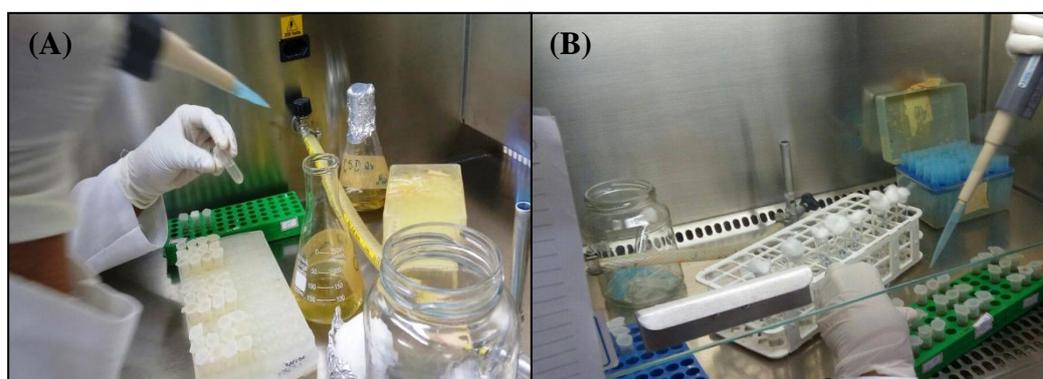


Figura 27: Preparação dos Eppendorffs para os ensaios antibacterianos. (A) Adição do meio de cultura. (B) Adição dos inóculos. Fonte: A autora, 2017.

- Microdiluição

Foram pipetados 100 μ L do conteúdo de cada Eppendorff (contendo o inóculo e o meio de cultura) em cada poço. Logo em seguida, 100 μ L do produto na concentração de 1.024 μ g/ml foram depositados no primeiro poço, homogeneizado e retirada uma alíquota de 100 μ L que foi inserida no segundo poço e assim sucessivamente até o penúltimo. O controle de esterilidade recebeu apenas o meio de cultura (Figura 28).

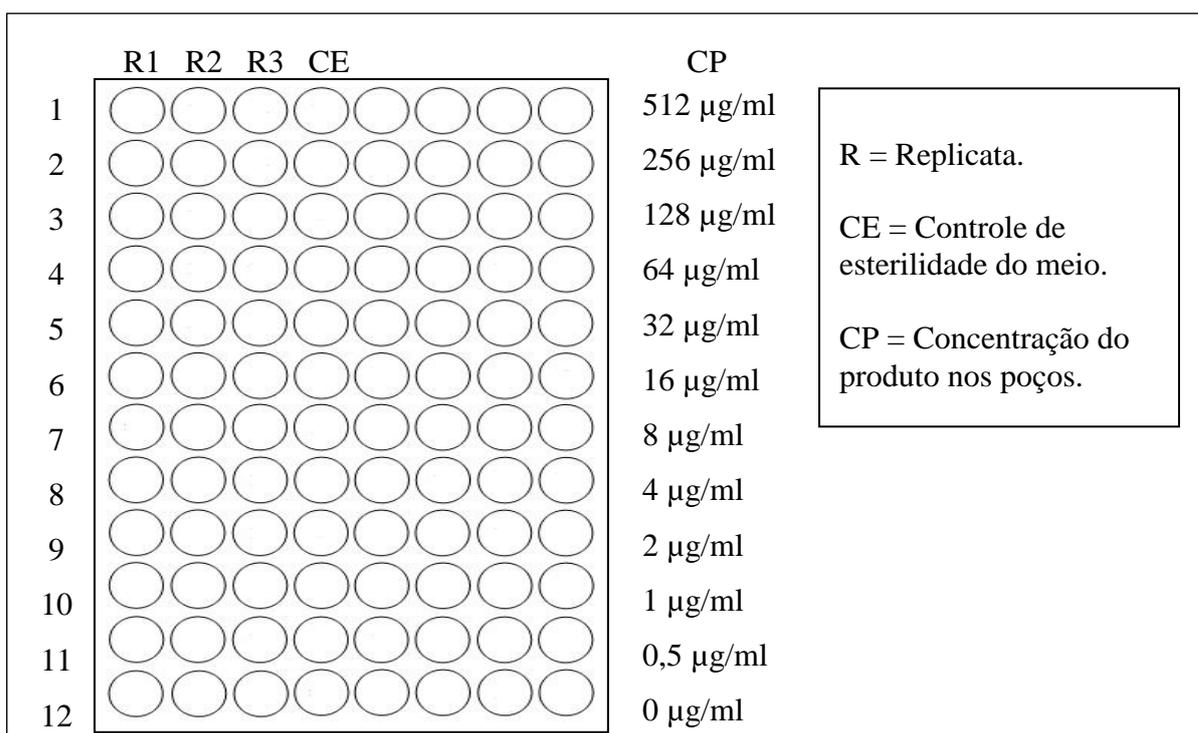


Figura 28: Esquema de microdiluição para os ensaios antibacterianos. Fonte: A autora, 2017.

As placas (Figura 29) foram em seguida colocadas para incubar em estufa a 36°C por 24h.

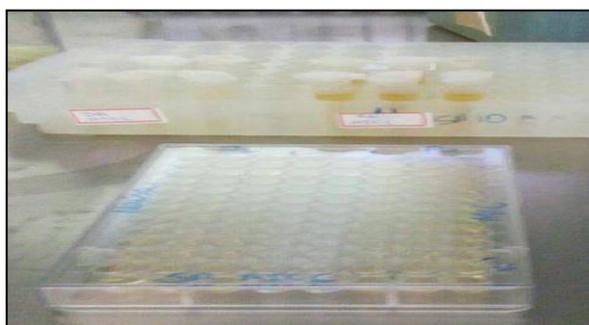


Figura 29: Placa de Petri do ensaio antibacteriano pronta para incubação. Fonte: A autora, 2017.

- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi considerada a menor concentração onde não houve crescimento bacteriano. Para verificar os poços em que houve sobrevivência e/ou crescimento bacteriano foram adicionados 20 μL de resazurina e deixados agir por 1 h (Figura 30). O aparecimento de uma coloração rosa indica que existem bactérias vivas no meio e a permanência da coloração azul indica o oposto.

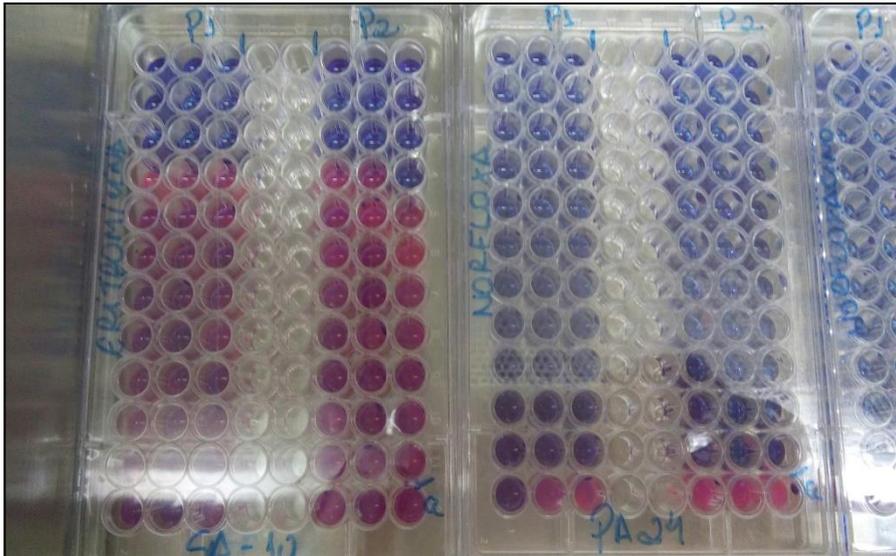


Figura 30: Leitura da CIM (Concentração Inibitória Mínima) do ensaio de modificação da resistência bacteriana com o reagente resazurina. Fonte: A autora, 2017.

- Efeito modificador da resistência bacteriana

Para determinar se os produtos possuíam algum efeito modificador da resistência bacteriana, utilizamos antibióticos amplamente utilizados no mercado (Norfloxacin, Gentamicina e Eritromicina) contra as cepas multirresistentes e avaliamos a sua CIM na presença e na ausência dos produtos em concentrações subinibitórias (CIM/16), seguindo a mesma metodologia citada anteriormente.

Contudo, o conteúdo dos Eppendorfs passa a ser 188 μL do produto na concentração subinibitória, 150 μL do inóculo e 1.162 μL do meio de cultura. Além do controle de esterilidade (1.500 μL do meio), também é feito o controle negativo de modulação, cujo Eppendorf recebe apenas o inóculo (150 μL) e o meio (1.350 μL) e o controle positivo com o antibiótico.

A microdiluição é feita na placa de 96 poços com o antibiótico nas mesmas condições e concentrações da seção anterior, assim como também a leitura da CIM.

6.6 Protocolo do Teste Antifúngico e Modificador da Resistência

- Semeio das cepas fúngicas

As cepas fúngicas utilizadas no teste foram provindas da Coleção de Culturas Oswaldo Cruz, cedidas pelo INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde). As espécies utilizadas foram: *Candida tropicalis* (CT INCQS 40042), *Candida albicans* (CA INCQS 40006) e *Candida krusei* (CK INCQS 40095).

Antes do teste as cepas foram cultivadas em meio sólido *Ágar Sabouraud Dextrose* (ASD), diluído em água destilada e esterilizado a 121 °C em autoclave por 15 minutos. As placas de Petri contendo as cepas foram incubadas em estufa a 36°C por 24h (Figura 31).

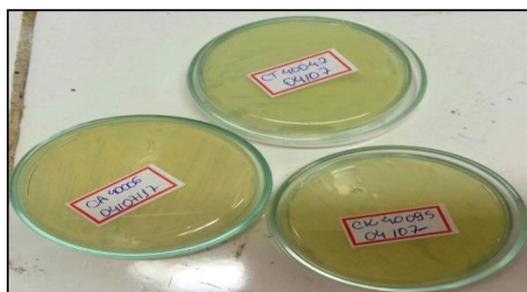


Figura 31: Placas de Petri contendo as cepas fúngicas incubadas em meio sólido.

Fonte: A autora, 2017.

- Preparação dos Inóculos

Foram preparados 3 inóculos para cada cepa na concentração de 10^5 Unidades Formadoras de Colônias /ml em tubos de ensaio com solução salina a 0,9% (Figura 32). Esta concentração foi determinada pela escala de Mac Farland, que equivale ao padrão de turvação do tubo 0,5 da escala.



Figura 32: Inoculação das cepas fúngicas em solução salina. Fonte: A autora, 2017.

- Diluição dos Produtos

Para cada produto 0,15g da fração foi diluído em DMSO, agitado em vórtex e depois adicionada água destilada para atingir uma concentração final de 16.384 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 33).



Figura 33: Diluição dos produtos para os ensaios antifúngicos (adição de DMSO e água destilada). Fonte: A autora, 2017.

- Preparação dos Eppendorfs

Antes da microdiluição os Eppendorffs receberam 1.350 μL do meio líquido CSD (Caldo Saboraud Dextrose) e 150 μL do inóculo (Figura 34). O controle esterilidade recebeu apenas 1.500 μL do meio de cultura e o controle de diluição recebeu 1.350 μL do meio e 150 μL de solução salina a 0,9%.



Figura 34: Preparação dos Eppendorfs para os ensaios antifúngicos (adição de meio de cultura e inóculo). Fonte: A autora, 2017.

- Microdiluição

Todos poços receberam 100 μ L das soluções dos Eppendorffs. Posteriormente, 100 μ L do produto natural na concentração de 16.384 μ g/ml foram depositados no poço 1, homogeneizado e logo após, uma alíquota foi retirada e inserida no poço 2 e assim sucessivamente até o penúltimo poço.

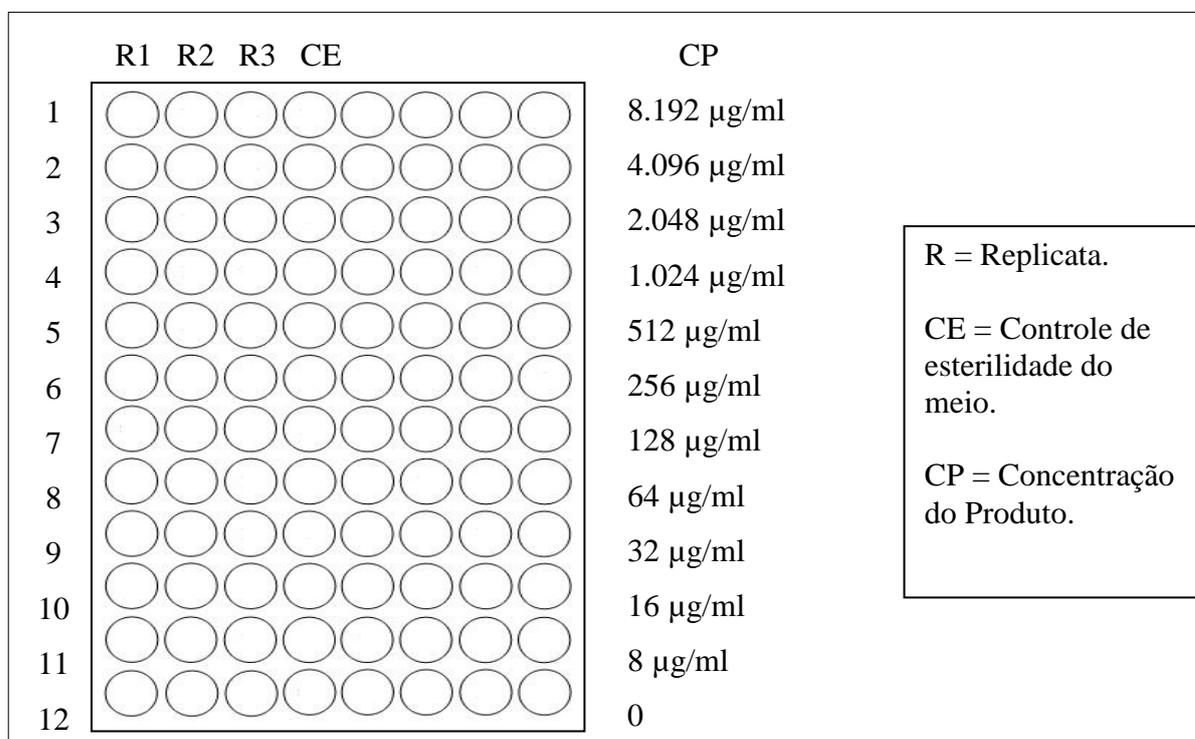


Figura 35: Esquema de microdiluição para os ensaios antifúngicos. Fonte: A autora, 2017.

- Leitura da CI_{50} (Concentração que inibe o crescimento fúngico em 50%)

As placas foram colocadas para a incubar em estufa a 36°C por 24 h (Figura 36-A). Passadas as 24 h a leitura da absorbância foi realizada em aparelho de espectrofotometria de ELISA (Termoplate®) a 630 nm no modo “Curva de Sobrevivência” (Figura 36-B). Os dados foram utilizados para a obtenção de uma curva de viabilidade celular. Para tal, o último poço (que não recebeu o produto) foi considerado o controle de crescimento das leveduras.

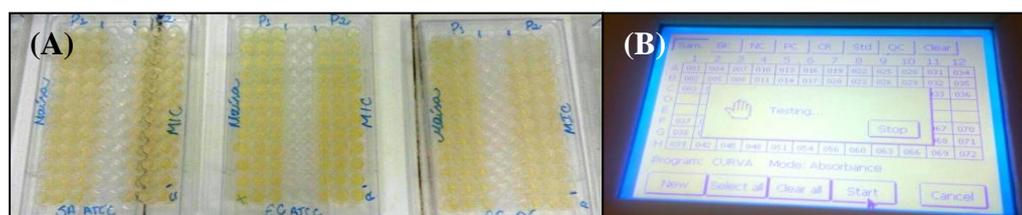


Figura 36: Leitura da CI_{50} para os ensaios antifúngicos. (A) Placa de Petri após incubação pronta para a leitura da absorbância. (B) Realização da leitura pelo ELISA (Termoplate®). Fonte: A autora, 2017.

- Determinação da CFM (Concentração Fungicida Mínima)

Uma haste estéril foi mergulhada em cada poço e, após homogeneizar o meio contido no poço, foi subclavada em uma placa de Petri contendo o meio ASD (Figura 37).

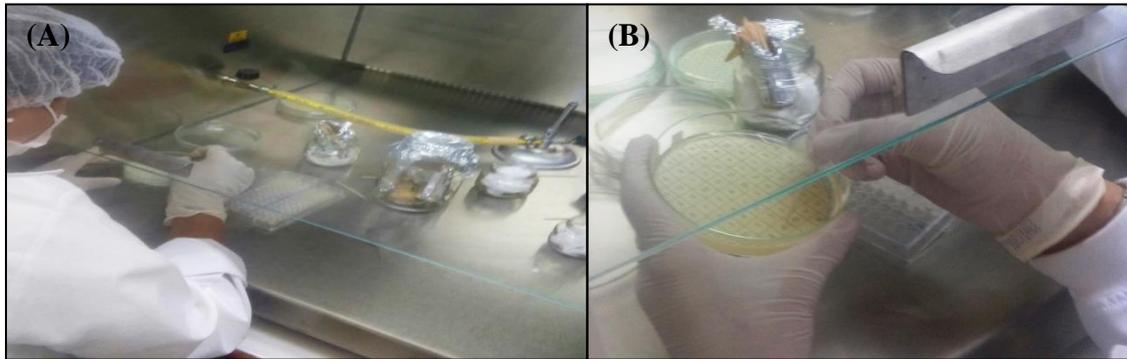


Figura 37: Determinação da CI_{50} para os ensaios antifúngicos. (A) Haste estéril após ser mergulhada no poço é subclavada em Placa de Petri. (B) Placa de Petri contendo meio de cultura. Fonte: A autora, 2017.

Com o auxílio de uma cartela guia, em cada espaço da placa foi inoculado o conteúdo de um poço (Figura 38-A) e as placas foram incubadas a 36 °C por mais 24 horas (Figura 38-B). Passado esse tempo, as placas de Petri foram analisadas através do crescimento (ou não crescimento) das colônias, sendo a CFM mensurada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível das colônias fúngicas.

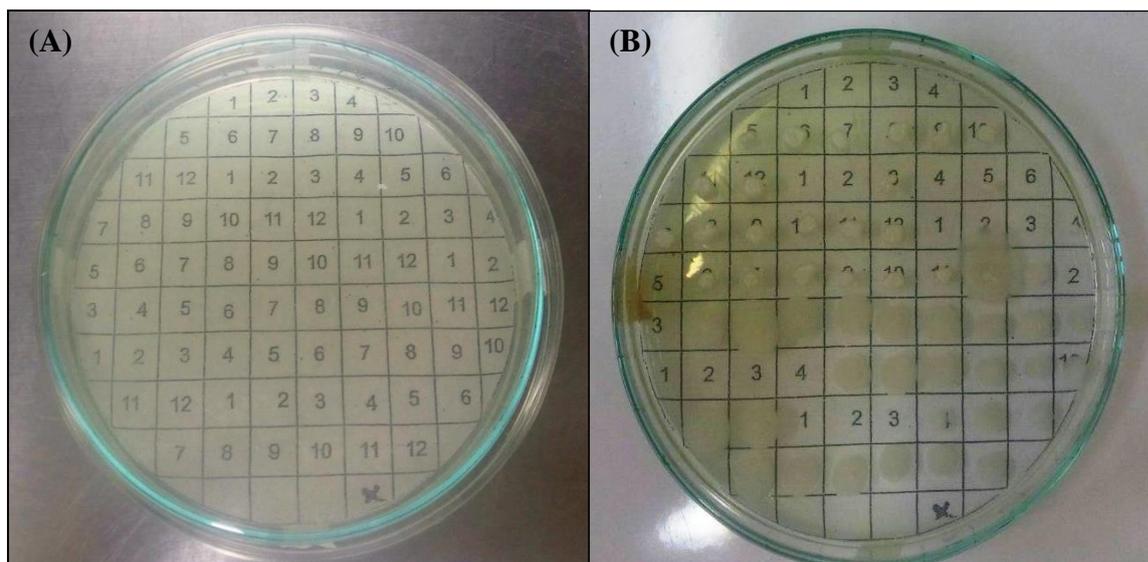


Figura 38: Leitura da CFM (Concentração Fungicida Mínima). (A) Placa de Petri logo após a inoculação do conteúdo dos poços. (B) Placa de Petri após incubação. Fonte: A autora, 2017.

- Modificação da Resistência Fúngica

Para a avaliação do efeito modificador da resistência fúngica, utilizamos os produtos na concentração subinibitória (CFM/16) com a droga de referência, neste caso o fluconazol. Os procedimentos para o cálculo da MIC e da CFM seguiram a mesma metodologia citada na seção anterior, divergindo em apenas dois quesitos. Os Eppendorffs dos testes receberam o inóculo (150 μ L), o produto na concentração subinibitória e o meio de cultura. A microdiluição seriada foi realizada com a droga de referência nas mesmas concentrações utilizadas na CIM e na CFM, bem como os procedimentos de leitura.

Declaração sobre plágio

Eu, Maísa Fernanda dos Santos Barbosa, autora da dissertação intitulada “Bioprospecção Farmacológica De *Erythroxylum Revolutum* Mart.: Caracterização Fitoquímica E Avaliação Do Efeito Antimicrobiano E Modificador Da Resistência Microbiana”, vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Unidade Acadêmica de Serra Talhada da Universidade Federal Rural de Pernambuco, declaro que:

- O trabalho de pesquisa apresentado nesta dissertação, exceto onde especificado, representa uma pesquisa original desenvolvida por mim;
- Esta dissertação não contém material escrito ou dados de terceiros, de qualquer fonte bibliográfica, a menos que devidamente citada e referenciada no item “Referências Bibliográficas”.

Serra Talhada, 22 de Abril de 2018.