



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Departamento de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO *in vitro* DE *Trichilia catigua* E
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO OLIGOMÉRICA AQUOSA

MARIANE ROBERTA RITTER

MARINGÁ, 2016

MARIANE ROBERTA RITTER

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO *in vitro* DE *Trichilia catigua* E
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO OLIGOMÉRICA AQUOSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração - Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para a obtenção do título em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Co-orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

MARINGÁ, 2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE PESQUISA OU ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

R614a Ritter, Mariane Roberta
Avaliação do potencial antimicrobiano *in vitro* de *Trichilia catigua* e caracterização química da fração oligomérica aquosa/ Mariane Roberta Ritter. -- Maringá, 2016.
104 f. il., color, figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

Coorientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.

1. Fitoterapia. 2. Microbiologia. 3. *Trichilia catigua*. 4. Triagem microbiológica. 5. Métodos cromográficos. 6. Leveduras. 7. Dermatófitos. I. Mello, João Carlos Palazzo, orient. II. Nakamura, Celso Vaturu. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 22. ED. 615.321

JLM-001943

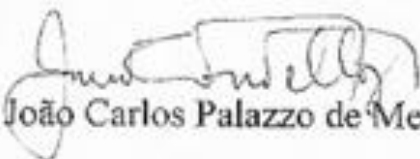
MARIANE ROBERTA RITTER

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *TRICHILIA*
CATIGUA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO
OLIGOMÉRICA AQUOSA**

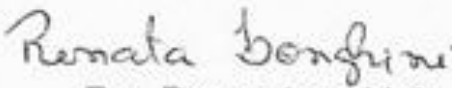
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 23 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA


Dr. João Carlos Palazzo de Mello


Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior


Dra. Renata Longhini

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Farmacêutica, Palafito, Bloco K80, salas 13 e 14, Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (Comcap), Laboratório de Microbiologia bloco I90 e Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina.

Partes deste trabalho foram apresentadas nos seguintes eventos:

1) RITTER, M. R.; OLIVEIRA, M. T.; CALEARE, A. O.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P. Potential antioxidant and antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* of *Trichilia catigua*. In: 10th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), 2015, Ribeirão Preto-SP. Abstract 475-1.

2) RITTER, M. R.; OLIVEIRA, M. T.; SEREIA, A. L.; CALEARE, A. O.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P. Análise química da fração aquosa de *Trichilia catigua* e atividade antimicrobiana *in vitro* frente à *Helicobacter pylori*. In: VI Seminário Anual do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, 2015, Maringá-PR.

Dedico esta dissertação a minha mãe Ana Maria e minha querida avó Glória por todo o exemplo, amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o amor e incentivo, principalmente à minha mãe Ana Maria e minha avó Gloria que sempre acreditaram mais em mim do que eu mesma...

Ao Professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello pela oportunidade, conhecimentos e merecidos “puxões de orelha” quando esses se fizeram necessários. Essa oportunidade não foi importante somente para meu crescimento profissional, como também pessoal. Serei eternamente grata!

Aos meus amigos que mesmo longe sempre se fizeram presentes, em especial aos que fiz aqui, que por muitas vezes foram minha família.

A toda família Palafito pela amizade e auxílio: Ana Carolina Guidi, Leticia Maria Kryzaniak, André Oliveira, Andressa Blainski, Emilene Dias, Fernanda Bueno, Leila Marques, Luana Magri Tunin, Tânia Antonelli, Naiara Gancedo, Thiago Henrique Brito de Souza, Mariana Nascimento, Thaisa Dalla Valle Rörig Ribeiro, Daniela Medeiros, Raquel Isolani, Renata Longhini e Gisely Lopes. Pessoas especiais que guardarei por toda a vida.

À Ana Luiza Sereia pela amizade e auxílio com Eletroforese Capilar.

Ao Marcelo Tempesta pela amizade, paciência, conhecimentos transmitidos, auxílio em microbiologia e parceria de colunas cromatográficas.

À Regina Makimori, que além da amizade, salvou minha vida com as análises microbiológicas!

Ao Admir Arantes pela amizade, auxílio técnico e risadas infinitas.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, doutorando Angelo Caleare e aluna Karina Myiuki pelo auxílio com *H. pylori*.

Ao Dr. Admilton de Oliveira Junior, Universidade Estadual de Londrina, pelo auxílio com *Enterococcus*.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Capes pela bolsa concedida.

A todos aqueles que de alguma forma participaram desta importante etapa da minha vida.

E por fim a Deus pelas oportunidades e pessoas maravilhosas que colocou em minha vida até agora.

A todos o meu muito obrigada!

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin



Mariane Roberta Ritter nasceu em Medianeira-PR, no dia 16 de abril de 1990, filha de Ana Maria Olivo e Clovis Roberto Ritter. Estudou no Colégio Estadual João Manoel Mondrone, onde se formou no ensino médio. No ano de 2009 iniciou o curso de Farmácia na Faculdade Anglo Americano, em Foz do Iguaçu-PR. Em 2014 iniciou o Mestrado na Universidade Estadual de Maringá (UEM) no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos. Realizou suas atividades na área de Fitoquímica, no Laboratório de Biologia Farmacêutica – Palafito, sob a orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

RESUMO

RITTER, MR. 2016. Avaliação do potencial antimicrobiano *in vitro* de *Trichilia catigua* e caracterização química da fração oligomérica aquosa. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 105p.

Trichilia catigua A. Juss. (Meliaceae) é uma árvore conhecida como "Catuaba" ou "Catiguá" e está amplamente distribuída no Brasil, sendo muito utilizada na medicina popular. Estudos realizados com as cascas de *T. catigua* sugerem que esta planta apresenta atividade antimicrobiana, antinociceptiva, afrodisíaca, antioxidante, antidepressiva e ação preventiva contra danos cerebrais. Este trabalho teve como objetivo a separação e caracterização da fração semipurificada aquosa obtida a partir das cascas de *T. catigua* mediante ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C , cromatografia em coluna e eletroforese capilar, bem como o desenvolvimento metodológico. Além disso, foi realizada triagem microbiológica contra bactérias e fungos, sendo eles: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (EFRV), *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum gypseum*. As análises microbiológicas foram realizadas por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), sendo que para *H. pylori* também foi realizada turbidimetria e avaliação de atividade bactericida. Primeiramente foi produzido o extrato bruto (EB) de catuaba, que posteriormente foi particionado originando a fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ). Os métodos cromatográficos desenvolvidos para FAQ demonstraram eficácia na caracterização das proantocianidinas oligoméricas de *T. catigua*, sendo que o espectro de RMN de ^{13}C sugeriu a presença de proantocianidinas e de cinchonaínas do tipo I e II como substâncias oligo ou mesmo poliméricas. Com relação à atividade antimicrobiana, os extratos apresentaram resultados expressivos principalmente para *E. faecium* e EFRV com CIM de 312,5 a 156,5 $\mu\text{g/ml}$. Numa avaliação geral, a FAE demonstrou melhores resultados, principalmente para as cepas Gram-positivas e fungos. Na determinação turbidimétrica, a FAQ se mostrou promissora contra *H. pylori*. Os resultados obtidos sugerem que os extratos de *T. catigua* apresentam potencial aplicação como adjuvante ao tratamento e promissor ao desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas.

Palavras Chave: *Trichilia catigua*, triagem microbiológica, métodos cromatográficos, leveduras, dermatófitos.

ABSTRACT

RITTER, MR. 2016. Evaluation of *in vitro* antimicrobial potential of *Trichilia catigua* and chemical characterization of aqueous oligomeric fraction. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 105p.

Trichilia catigua A. Juss. (Meliaceae) is a tree known as "Catuaba" or "Catiguá" and is widely distributed in Brazil and commonly used in folk medicine. Studies with the barks of *Trichilia catigua* suggest that this plant has antimicrobial, antinociceptive, aphrodisiac, antioxidant, antidepressant activities and preventive action against brain damage. This study aimed to separation and characterization of aqueous semipurified fraction obtained from the barks of *Trichilia catigua* by nuclear magnetic resonance (NMR) ^{13}C , column chromatography and capillary electrophoresis which was also carried out the methodological development. In addition, we performed the microbiological screening against bacteria and fungi, being them *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecium* vancomycin-resistant (EFVR), *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* and *Microsporum gypseum*. Microbiological analyzes were performed by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), and *H. pylori* was also conducted turbidimetry and evaluation of bactericidal activity. It was first produced the crude extract (CE) of catuaba, which was subsequently partitioned giving the ethyl acetate fraction (EAF) and aqueous fraction (AQF). The chromatographic methods developed to AQF demonstrated efficacy in the characterization of oligomeric proanthocyanidin of *T. catigua*, and the ^{13}C NMR spectrum suggested the presence of proanthocyanidins and cinchonans type I and II as oligo or polymeric compounds. Regarding the antimicrobial activity, the extracts showed significant results especially for *E. faecium* and EFVR with MIC from 312,5 to 156,5 $\mu\text{g/ml}$. An overall assessment, the EAF has shown better results, especially for Gram-positive strains and fungi. In determining turbidity, the AQF has shown considerable promise against *H. pylori*. The results suggest that *T. catigua* extracts have potential application as an adjunct to treatment and promising to develop new antimicrobial drugs.

Keywords: *Trichilia catigua*, screening, chromatographic methods, yeast, dermatophytes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Aspecto macroscópico das cascas de <i>T. catigua</i> .	25
2	Compostos isolados a partir de frações clorofórmicas do extrato etanólico das cascas de <i>Trichilia catigua</i> .	27
3	Substâncias isoladas do extrato acetato de etila das cascas secas de <i>Trichilia catigua</i> .	28
4	Substâncias isoladas da <i>Trichilia catigua</i> : epicatequina (17), procianidina B2 (18), procianidina B4 (19), procianidina C1 (20), cinchonaína IIa (21), IIb (22) e apocinina E (23).	29
5	Substâncias isoladas a partir do extrato metanólico de <i>Trichilia catigua</i> .	30
6	Exemplos de proantocianidinas diméricas (A- epicatequina-(4 β →8)-catequina; B-epicatequina-(4 β →6)-catequina.	34
7	Estruturas dos monômeros básicos de taninos condensados.	34
8	Fluxograma de preparação de extratos a partir das cascas de <i>Trichilia catigua</i>	49
9	RMN 13C no estado sólido da FAQ de <i>Trichilia catigua</i>	60
10	Eletroferogramas da FAQ de <i>Trichilia catigua</i> com detecção a 200, 214 e 254 nm. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; pH 8,8; capilar 75 μ m; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); FAQ: 1 mg/ml	63
11	Eletroferogramas da FAQ de <i>Trichilia catigua</i> com capilares de 75 e 100 μ m. Condições eletroforéticas: detecção a 214 nm; tampão borato 80 mmol; pH 8,8; voltagem: 20 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); FAQ: 1 mg/ml.	64
12	Eletroferogramas da FAQ de <i>Trichilia catigua</i> . Condições eletroforéticas: detecção a 214 nm; capilar de 75 μ m; tampão borato 80 mmol; pH 8,8 e tampão fosfato 70 mmol; pH 7,0; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); FAQ:1 mg/ml.	65
13	Eletroferogramas da FAQ de <i>Trichilia catigua</i> em diferentes concentrações da solução eletrolítica. Condições eletroforéticas: tampão borato 60, 80 e 100 mmol; pH 8,8; capilar 75 μ m; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAQ: 1 mg/ml.	66
14	Eletroferogramas da FAQ de <i>Trichilia catigua</i> em diferentes pHs de solução eletrolítica. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; capilar 75 μ m; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAQ: 1 mg/ml.	67
15	Eletroferogramas da FAQ de <i>Trichilia catigua</i> com adição de diferentes seletos quirais. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; pH 8,8; capilar 75 μ m; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAQ: 1 mg/ml.	68
16	Eletroferogramas da FAQ de <i>Trichilia catigua</i> no método de zona e micelar. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; pH 8,8; capilar 75 μ m; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAQ: 1 mg/ml.	69

17	Eletoferogramas da FAQ de <i>Trichilia catigua</i> . Condições eletroforéticas: detecção a 214 nm; capilares de 75 µm; tampão borato 80 mmol; pH 8,8; voltagem: 15, 20, 25 e 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); FAQ: 1 mg/ml.	70
18	Eletoferograma otimizado da FAQ de <i>Trichilia catigua</i> . Condições eletroforéticas: eletroforese capilar de zona; tampão borato 80 mmol pH 8,8; capilar 75 µm; voltagem: 20 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAQ: 1 mg/ml.	71
19	CCD do fracionamento da FAQ de <i>Trichilia catigua</i> observado sob luz UV à 254 e 365 nm.	72
20	Eletoferogramas de FAQ, F1 e F2 de <i>Trichilia catigua</i> . Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; pH 8,8; capilar 75 µm; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; amostras à 1 mg/ml.	73
21	CCD do fracionamento de F2 de <i>Trichilia catigua</i> , observado sob luz UV à 254 nm.	74
22	Eletoferogramas das subfrações F2.1, F2.2 e F2.3 da FAQ de <i>Trichilia catigua</i> . Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; pH 8,8; capilar 75 µm; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; Amostras à 1 mg/ml.	75
23	CCD do fracionamento de F2.3 de <i>Trichilia catigua</i> observado sob luz UV à 254 nm.	75
24	CCD do fracionamento de F2.3 de <i>Trichilia catigua</i> observado sob luz UV à 365 nm.	76
25	Eletoferogramas das subfrações F2.3-1, F2.3-2, F2.3-3 e F2.3-4 da FAQ de <i>Trichilia catigua</i> . Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol ; pH 8,8; capilar 75 µm; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; amostras à 1 mg/ml.	78
26	Eletoferogramas das subfrações F2.3-5, F2.3-6, F2.3-7 e F2.3-8 da FAQ de <i>Trichilia catigua</i> . Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; pH 8,8; capilar 75 µm; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; amostras à 1 mg/ml.	78
27	Eletoferogramas das subfrações F2.3-9, F2.3-10, F2.3-11 e F2.3-12 da FAQ de <i>Trichilia catigua</i> . Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; pH 8,8; capilar 75 µm; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; amostras à 1 mg/ml.	79
28	Eletoferogramas das subfrações F2.3-13, F2.3-14, F2.3-15 e F2.3-16 da FAQ de <i>Trichilia catigua</i> . Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; pH 8,8; capilar 75 µm; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; amostras à 1 mg/ml.	79
29	Fluxograma de obtenção das sufrações de FAQ de <i>Trichilia catigua</i> .	80
30	Análise turbidimétrica dos extratos de <i>Trichilia catigua</i> contra <i>H. pylori</i> . Estatisticamente diferente em relação ao controle: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (ANOVA seguido de teste de Dunnet)	82

LISTA DE TABELAS

TABELA	TÍTULO	PÁGINA
1	Preparo de soluções estoque para tampão borato.	53
2	Eluição em gradiente crescente por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 para FAQ (2 g) de <i>Trichilia catigua</i> .	53
3	Eluição em gradiente decrescente por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 contendo FAQ (2 g) de <i>Trichilia catigua</i> .	54
4	Eluição da subfração F2.3 (1,950 g) de <i>Trichilia catigua</i> por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20.	54
5	Rendimento, polifenóis totais e capacidade antioxidante das frações de <i>Trichilia catigua</i> .	58
6	Subfrações e rendimentos coluna F2.3 de FAQ de <i>Trichilia catigua</i> .	77
7	Triagem microbiológica dos extratos de <i>Trichilia catigua</i> por CIM.	81

LISTA DE QUADROS

QUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1	Grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos de taninos condensados.	35
2	Perfil de resistência do isolado 170: ampicilina (AMP), ciprofloxacino (CIP), eritromicina (ERI), estreptomicina (EST), teicoplanina (TEI), tetracilina (TET), vancomicina (VAN). Fonte: Ruzón et al., 2010).	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

μ - Micro

δ – Deslocamento químico

AA – Ácido aracdônico

AMH – Ágar Miller-Hinton

BSA – Albumina sérica bovina

BHT – Butil-hidroxi-tolueno

CagA – Citotoxina associada ao gene A

CC – Cromatografia em coluna

CCCAV – Cromatografia em contra corrente de alta velocidade

CCD – Cromatografia de camada delgada

CDs - Ciclodextrinas

CEC – Eletrocromatografia capilar

CG– Cromatografia gasosa

CGE – Eletroforese capilar em gel

CIEF – Focalização isoeletrica capilar

CIM – Concentração inibitória mínima

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CMH – Caldo Millher-Hinton

CSD – Caldo Sabourand dextrose

CZE – Eletroforese capilar de zona

DC – Dicroísmo circular

DMSO–Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-difenil-1-hidrazila-picril

EB– Extrato Bruto

FAE – Fração de acetato de etila

FAQ – Fração aquosa

FLU–Fluconazol

IL-8 – Interleucina 8

kV – Quilovolts

MEKC – Eletroforese capilar micelar

OMS – Organização Mundial da Saúde

PDA – Arranjo de diodos

PLA₂ – Fosfolipase A₂

POG – Privação do oxigênio glicose

ppm – Partes por milhão

PT – Polifenóis totais

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SM – Solução mãe

TET – Tetraciclina

TFA – Ácido trifluoroacético

UV – Ultra violeta

VacA – Citotoxina vacuolizante A

VAN – Vancomicina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 ASPECTOS GERAIS	23
2.1.1 Família Meliaceae	23
2.1.2 Gênero <i>Trichilia</i>	23
2.1.3 <i>Trichilia catigua</i> A. Juss.	24
2.2 ASPECTOS QUÍMICOS	31
2.2.1 Substâncias fenólicas	31
2.2.2 Taninos.....	32
2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DE <i>Trichilia catigua</i>	35
2.4 MICRO-ORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO	38
2.4.1 <i>Helicobacter pylori</i>	38
2.4.2 <i>Enterococcus faecium</i>	39
2.4.3 <i>Escherichia coli</i>	40
2.4.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
2.4.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	40
2.4.6 <i>Bacillus subtilis</i>	41
2.4.7 Gênero <i>Candida</i>	41
2.4.8 Fungos dermatófitos	43
2.5 ELETROFORESE CAPILAR.....	44
3 OBJETIVOS.....	46
3.1 OBJETIVO GERAL	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	47
4.2 SOLVENTES E REAGENTES	47
4.3 EQUIPAMENTOS	48
4.4 PREPARAÇÃO DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO AQUOSA	49
4.5 ANÁLISES QUÍMICAS QUANTITATIVAS.....	49
4.5.1 Determinação do teor de polifenóis totais	49
4.5.2 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical 2-2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	50
4.6 ANÁLISE QUÍMICA DA FRAÇÃO SEMIPURIFICADA DE <i>Trichilia catigua</i>	51
4.6.1 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no Estado Sólido	51

4.6.2 Métodos cromatográficos	51
4.7 TRIAGEM MICROBIOLÓGICA	55
4.7.1 Condições de crescimento	55
4.7.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	56
4.7.3 Determinação da concentração bactericida mínima de <i>H. pylori</i>	57
4.7.4 Avaliação dos extratos sobre ergosterol de leveduras	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH	58
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO AQUOSA	59
5.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no Estado Sólido	59
5.2.2 Desenvolvimento de metodologia por eletroforese capilar (EC)	62
5.3 SEPARAÇÃO DA FAQ DE <i>Trichilia catigua</i>	72
5.3.1 Cromatografia em coluna	72
5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	81
6 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS	87
APÊNDICE	105

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são os mais antigos recursos empregados no tratamento de doenças. Elas se destacam não apenas pelas ações terapêuticas intrínsecas e como um acesso primário a saúde, mas também pelo potencial de desenvolvimento de novos medicamentos (SILVA, 2004). Estima-se que cerca de 30% dos fármacos atuais são derivados de produtos naturais (VEIGA JUNIOR & MELLO, 2008).

A utilização de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos têm sido aceitos como alternativa terapêutica em todo o mundo, especialmente no Brasil. Vários estudos envolvendo a flora brasileira têm sido realizados para avaliar sua importância nos aspectos econômicos, medicinais, sociais e de biodiversidade (BASSANI, 2005). Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial faz uso da medicina tradicional (SPRINGFIELD et al., 2005).

A fitoterapia no Brasil é uma opção de tratamento que se utiliza no atendimento primário a saúde de várias localidades (ELDIN & DUNFORD, 2001). A expansão da fitoterapia está relacionada à crescente comprovação das propriedades farmacológicas, aplicação de novos métodos analíticos para o controle de qualidade, relativo baixo custo, preferência da população por tratamentos considerados “naturais” e efeitos adversos produzidos por medicamentos sintéticos (CAÑIGUERAL et al., 2003; MELO et al., 2007). A indústria brasileira de fitoterápicos, por sua vez, movimentou no ano de 2014 cerca de 261 milhões de dólares (DUTRA, et al., 2016).

O Brasil se destaca no cenário científico mundial na área de plantas medicinais, pois possui cerca de um terço da flora mundial, além do fato da Amazônia ser considerada a maior reserva de produtos naturais do mundo (YUNES et al., 2001; FRANÇA et al., 2008). Portanto, o país oferece uma integrativa terapêutica bastante promissora à população para o tratamento de doenças através da fitoterapia (ALEXANDRE et al., 2008).

Dentre o arsenal nacional de plantas com potencial terapêutico para produção de medicamentos fitoterápicos, destaca-se a *Trichilia catigua* A. Juss (Meliaceae), uma árvore amplamente distribuída por todo o território, popularmente conhecida como catuaba ou catiguá. As cascas da *T. catigua* são utilizadas para vários fins terapêuticos, como estimulante sexual, tratamento para estresse, déficit de memória e como antimicrobiano (PIZZOLATTI et al., 2002a).

O emprego de plantas medicinais com potencial antimicrobiano é relatado desde o Egito antigo. No Brasil, as pesquisas de substâncias com esse potencial iniciaram em 1948, a partir do isolamento dos primeiros componentes antimicrobianos (OLIVEIRA, 2004; SARTORI, 2005).

São candidatos para o desenvolvimento de antimicrobianos, substâncias que possuem sítios-alvo diferentes dos antibióticos conhecidos, o que é útil para o tratamento de infecções causadas por cepas resistentes (AHMAD & BAG, 2001). Entre as classes de compostos com atividade antimicrobiana conhecida, destacam-se: flavonoides, alcaloides, terpenos, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas e saponinas (VERDI et al., 2005).

Este trabalho teve por objetivo a caracterização química de taninos condensados oligoméricos da fração semipurificada aquosa obtida a partir das cascas de *T.catigua*, por meio Ressonância Magnética Nuclear, cromatografia líquida clássica e Eletroforese Capilar, e também realizar a triagem microbiológica do extrato bruto e frações de catuaba contra cepas bacterianas e fúngicas, sendo algumas resistentes e causadoras de infecções nosocomiais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS GERAIS

2.1.1 Família Meliaceae

A família Meliaceae é composta por aproximadamente 52 gêneros e 3.198 espécies, das quais apenas 669 são aceitas atualmente, distribuídas principalmente na região Neotropical, sendo que mais da metade das espécies pertencem a apenas 5 gêneros: *Trichilia*, *Aglaia*, *Guarea*, *Turraea* e *Dysoxylum*. Os gêneros que apresentam menor número de espécies são *Melia*, *Swietenia* e *Cedrela* (JUDD et al., 1999; THE PLANT LIST, 2013).

As plantas pertencentes a essa família são árvores, arboretas ou raramente arbusto, a disposição das folhas é em espiral, ordinariamente pinadas, com ou sem folículo terminal. Apresentam flores pequenas em inflorescências paniculadas terminais ou nas axilas superiores, hermafroditas, cíclicas, diclamídeas, de simetria radial. Sépalas e pétalas livres. Estames em número duplo ao das pétalas (em *Cedrela* só 5) em geral com filetes alargados soldados em um tubo, com as anteras fixas na porção superior interna. Ovários súperos com 4 a 5 carpelos e outros tantos lóculos, cada qual com 1 ou 2 óvulos (em *Swietenia* e *Cedrela* numerosos nos lóculos). Fruto em geral seco, capsular loculicida ou baciforme, com sementes com arilo ou aladas (JOLY, 1998).

Como exemplos brasileiros comuns destacam-se *Cedrela*, o popular cedro, cedro-rosa de excelente madeira avermelhada; *Carapa*, *Trichilia* e *Guarea* são também árvores comuns da mata tropical em geral conhecidas indistintamente como canjeranas, de madeira de boa qualidade; a primeira delas (*Carapa*) é chamada andiroba na região amazônica. Nesta região ainda são designadas como cedro-branco espécies de *Cedrela* e também de *Guarea* (JOLY, 1998).

Essa família apresenta espécies de grande potencial madeireiro e interesse econômico, assim são exploradas intensivamente em florestas tropicais (PENNINGTON, 1981; REITZ, 1984).

Estudos mostraram que alguns membros da família Meliaceae, como *Azadirachta indica* A. Juss., *Melia azedarach* L. e *Cedrela tubiflora* Bertoni possuem potentes propriedades anti-inflamatórias e antirreumáticas como consequência da sua ação sobre o sistema imunológico (BENENCIA et al., 2000).

2.1.2 Gênero *Trichilia*

O gênero *Trichilia* compreende cerca de 485 espécies, entre plantas legitimadas e sinônimos, com sua maioria, distribuídas na América Tropical, África e região Indo-Malaia (PENNINGTON, 1981 ; KLEIN, 1984; THE PLANT LIST, 2013).

Patrício e Cervi (2005) realizaram levantamento das espécies do gênero *Trichilia* P. Browne (Meliaceae) no Estado do Paraná, e referenciaram nove delas: *T. casaretti* C. DC., *T. claussoni* C. DC., *T. elegans* A. Juss. subsp. *elegans*, *T. lepidota* subsp. *schumanniana* (Harms) T. D. Penn., *T. pallens* C. DC, *T. pallida* Sw, *T. catigua* A. Juss., *T. pseudostipularis* (A. Juss.) C. DC. e *T. silvatica* C. DC.

As plantas do gênero *Trichilia* foram descritas como árvores ou arvoretas com folhas normalmente em formato de cravo e, menos frequentemente, trifoliolar ou unifoliolar. Os brotos, ordinariamente nus, raramente subtendidos por um ajuntamento de escamas foliares. As flores são geralmente unissexuadas (planta dioica). Pétalas (4 a 5), livres ou parcialmente unidas. Filamentos completamente unidos para formar um tubo estaminal. As sementes são carnosas, parcial ou completamente cercadas por um fino ou carnudo aro (PENNINGTON, 1981).

Bogorni e Vendramim (2003) avaliaram a eficiência de extratos aquosos de ramos e folhas de seis espécies de *Trichilia* (*T. casaretti*, *T. catigua*, *T. claussoni*, *T. elegans*, *T. pallens* e *T. pallida*), em comparação com a do extrato aquoso de sementes de *Azadirachta indica* A. Juss. (conhecida por nim) sobre a lagarta *Spodoptera frugiperda*, em condições de laboratório. Para as seis espécies testadas, pelo menos uma das estruturas (ramos ou folhas) afetou o desenvolvimento do inseto. O extrato de folhas de *T. pallens* causou mortalidade larval semelhante à causada pelo extrato de *Azadirachta indica* A. Juss. Os extratos de ramos de *T. pallens*, e de ramos e folhas de *T. pallida*, embora menos eficientes, também reduziram a sobrevivência e o peso larval de *S. frugiperda*. Esta lagarta é conhecida como lagarta-do-cartucho, é uma das principais pragas da cultura do milho (SILVA, 1997).

2.1.3 *Trichilia catigua* A. Juss.

Trichilia catigua A. Juss. (Meliaceae) é uma árvore conhecida como "Catuaba" ou "Catiguá" e esta amplamente distribuída no Brasil (KLEIN, 1984). A catuaba tem sido utilizada na medicina popular como um tônico para o tratamento de estresse, fadiga, impotência e contra os déficits de memória, também apresenta propriedades digestivas e purgativas (PIZZOLATTI et al., 2002b; CARLINI, 2007; VIANA et al., 2009).

A espécie apresenta-se como uma arvoreta com aproximadamente 3-5 metros de altura. Suas folhas são imparipinadas ou pinadas, folíolos alternos até opostos, oblanceolados, elípticos ou oblongos, ápice ordinariamente atenuado muitas vezes com a ponta um pouco emarginada, menos frequentemente acuminada, base quase sempre assimétrica, pilosas; flores unissexuais, plantas dioicas; inflorescência axilar ou diversas reunidas em cachos com curto rebento axilar; fruto cápsula estreitamente ovoide ou oblongo, com 1 a 2 sementes (KLEIN, 1984).

As cascas (Figura 1) apresentam-se de forma plana a levemente encurvadas, com súber de coloração esbranquiçado-acinzentada e aspecto grosseiramente granuloso, notando-se a presença de lenticelas circulares pequenas e fendas longitudinais curtas e superficiais. A parte interna (regiões cortical e floemática) é avermelhada com fibras finamente estriadas no sentido longitudinal; o odor é amadeirado, com sabor amargo e adstringente. Sua fratura é externamente granulosa e internamente fibrosa (OLIVEIRA et al., 2011).



Figura 1 - Aspecto macroscópico das cascas de *T. catigua*

A espécie vegetal registrada como catuaba na Farmacopeia Brasileira é a *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld ex De Souza (Bignoniaceae) (FARMACOPEIA, 1929). A catuaba apresenta 12 sinônimos, porém *Trichilia catigua* A. Juss. é considerado o nome legítimo, sendo a droga vegetal utilizada para fins medicinais no Brasil (BELTRAME et al., 2006; THE PLANT LIST, 2013).

No Brasil, *T. catigua* é comercializada associada com os extratos hidroalcoólicos de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Sapindaceae) e *Croton heliotropiifolius* Kunth. (Euphorbiaceae) sob a apresentação do Catuama®. Estudos realizados com Catuama® demonstraram atividade vasorelaxante em preparações vasculares de ratos (CALIXTO & CABRINI et al., 1997; QUITÃO et al., 2008), efeitos antinociceptivos de longa duração em vários modelos de nocicepção térmicas e químicas (VAZ et al., 1997), estimulante e afrodisíaco (ANTUNES et al., 2001), efeito antidepressivo em modelo animal (CAMPOS et al., 2004; CAMPOS et al., 2005) e atividade anti-inflamatória (QUITÃO et al., 2008).

Estudo toxicológico crônico da Catuama® realizado em indivíduos saudáveis verificou que não há reações adversas graves ou hematológicas e não foram relatadas alterações bioquímicas (OLIVEIRA et al., 2005).

2.1.3.1 Composição química

Pizzolatti e colaboradores (2002b) isolaram da fração acetato de etila das cascas da catuaba uma mistura de flavolignanas cinchonaínas Ia e Ib. As substâncias foram isoladas utilizando colunas de Sílicagel 60 e Sephadex LH- 20 e identificadas através da ressonância magnética nuclear (RMN).

Análises das frações clorofórmicas do extrato etanólico das cascas de *T. catigua* foram realizadas utilizando coluna Sílica gel 60 e cromatografia em fase gasosa (CG) acoplado a espectrômetro de massa (EM), as quais levaram à identificação de três ômega-fenil-ácidos alcanoides (1a-1c), cinco ômega-fenil-gama lactonas (2-6), duas alquil-gama lactona (7,8), uma alquenil-gama lactona (9) e uma mistura de ácidos graxos de C14 a C26(10a-10c) (Figura2). Além disso, foram identificados o beta-sitosterol, estigmasterol e campesterol como álcoois livres (PIZZOLATTI et al., 2004).

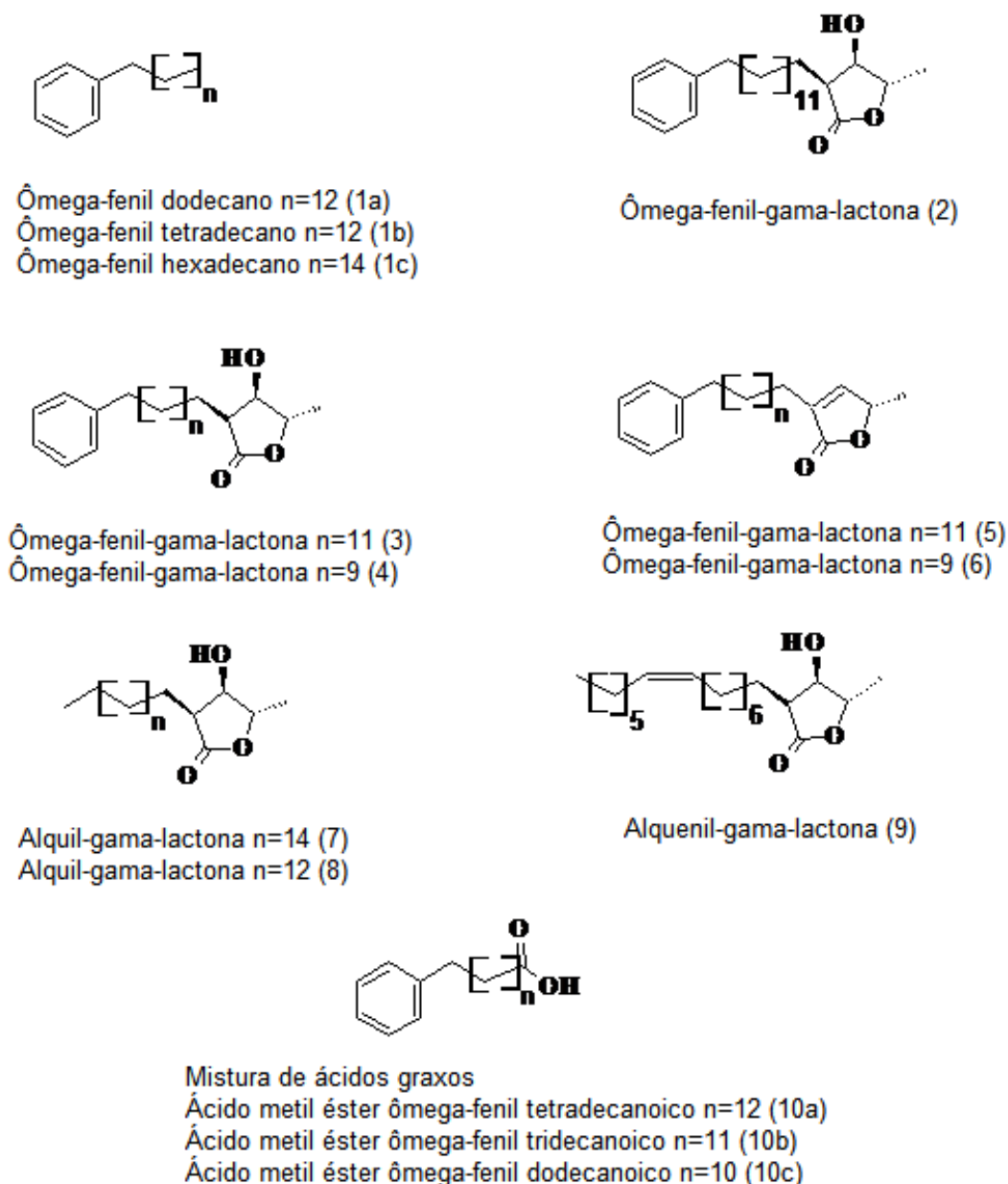


Figura 2 - Compostos isolados a partir de frações clorofórmicas do extrato etanólico das cascas de *Trichilia catigua*. Fonte: PIZZOLLATTI et al., 2004.

Kletter e colaboradores(2004) analisaram 14 amostras comerciais de cascas de catuaba comercializadas como espécies de *Anemopaegma*, *Erythroxylum* e *Trichilia*. Estas cascas foram identificadas e examinadas quanto à sua pureza. Apenas uma minoria dessas amostras de catuaba testadas continha a droga descrita nos rótulos, sendo que mais da metade dos produtos estava adulterado com diferentes drogas. Os perfis por cromatografia em camada delgada (CCD) confirmaram a heterogeneidade. Em 50% das amostras, alcaloides tropânicos foram detectados em várias concentrações. Foram desenvolvidos métodos de CCD e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a separação e

identificação dos alcaloides tropânicos, onde determinou-se a estrutura dos dois principais encontrados, como catuabina D e seu derivado hidroximetil.

Tang e colaboradores (2007) isolaram e identificaram, a partir dos extratos metanólicos das cascas de *T. catigua*, duas novas epicatequinas chamadas de catiguanina A (11) e catiguanina B (12), juntamente com quatro compostos conhecidos, cinchonaínas Ia (13), Ib (14), Ic (15), e Id (16) (Figura 3). As estruturas foram elucidadas pela análise de dados espectroscópicos e por comparação com dados de RMN.

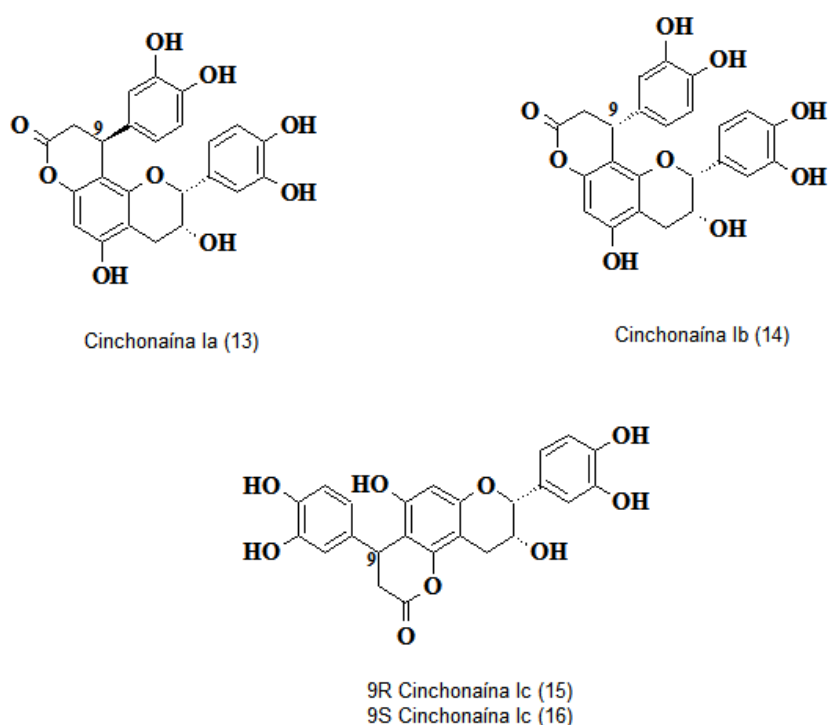


Figura 3 -Substâncias isoladas do extrato acetato de etila das cascas secas de *Trichilia catigua*.

Fonte: TANG et al., 2007.

A partir do extrato acetona:água (7:3; v/v) das cascas desta espécie foram isolados oito substâncias:epicatequina (17), procianidina B2 (18) [epicatequina-(4 β →8)-epicatequina], procianidina B4 (19) [catequina-(4 α →8)-epicatequina], procianidina C1 (20) [epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina],cinchonaínas IIa (21), IIb (22) e apocinina E (23)(Figura4). Para tal, foram obtidas a partir da fração semipurificada acetato de etila utilizando métodos cromatográficos, como cromatografia em coluna (CC), cromatografia em contra-corrente de alta velocidade (CCCAV) e cromatografia em camada delgada. As substâncias identificadas foram analisadas por meio de métodos espectroscópicos de RMN 1D (^1H e ^{13}C), RMN 2D (COSY ^1H - ^1H , HMQC e HMBC), espectrometria de massas (EM), espectroscopia de dicroísmo circular (DC) e polarimetria (RESENDE, 2007; RESENDE et al., 2011).

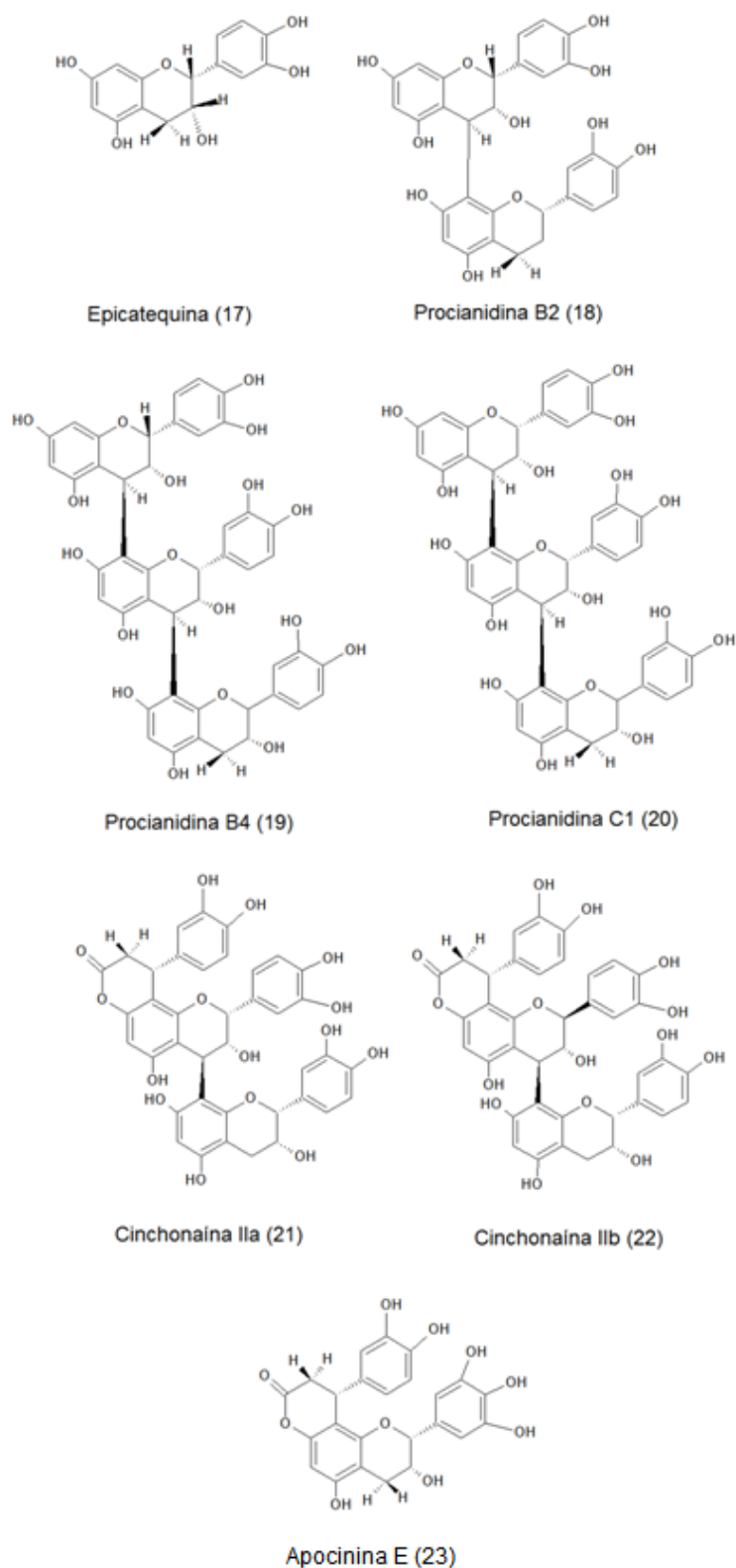


Figura 4 - Substâncias isoladas da *Trichilia catigua*: epicatequina (17), procianidina B2 (18), procianidina B4 (19), procianidina C1 (20), cinchonaina IIa (21), IIb (22) e apocinina E (23) Fonte: RESENDE et al., 2011.

Foi realizada investigação fitoquímica dos extratos dos frutos de *T. elegans* e *T. catigua*. A partir do extrato hexânico dos frutos de *T. elegans* foram isoladas e identificadas as substâncias cumarinas: escoporona, escopoletina, umbeliferona e na identificação da mistura dos esteroides: β -sitosterol, estigmasterol, campesterol e sitostenona. Enquanto que no extrato metanólico de *T. catigua* foram isoladas e identificadas as substâncias limonoides: cedrelona (25), angolensato de metila (26) e mistura epimérica de fotogedunina (27 e 28) (Figura 5)(MATOS et al., 2009).

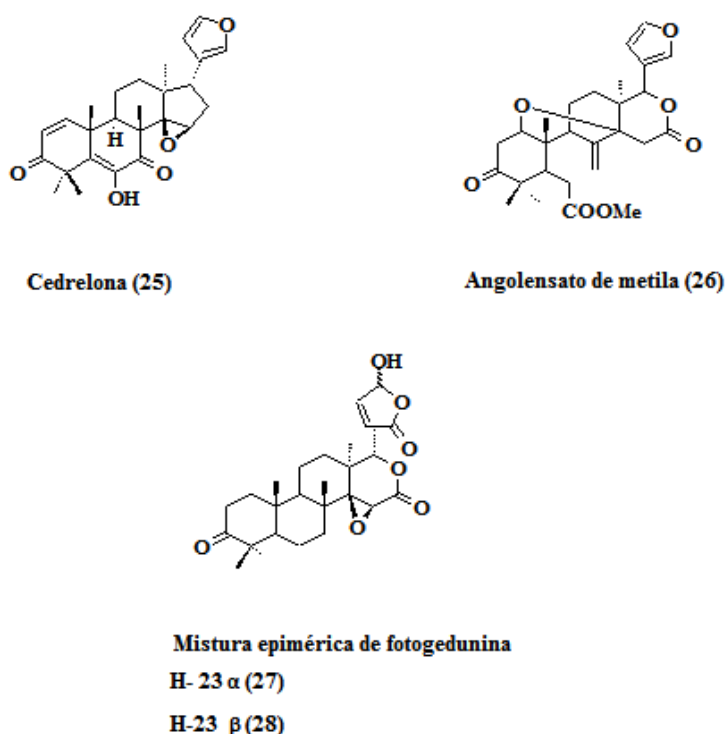


Figura 5 - Substâncias isoladas a partir do extrato metanólico de *Trichilia catigua*. Fonte: MATOS et al., 2009.

Um estudo de controle de qualidade farmacognóstico utilizando cascas de catuaba, lotes oriundos de Caetité (Bahia) e de Maringá (Paraná), confirmou a presença das classes de flavonoides, antracênicos, taninos e saponinas, e ausência de alcaloides, mucilagens, cumarinas e óleos essenciais. Verificou-se que as duas amostras possuem composição parecida, com teor de taninos 10,3 % (Paraná) e 12,5 % (Bahia) e teor de saponinas 21,4 % (Paraná) e 17,4 % (Bahia) (OLIVEIRA et al., 2011).

Beltrame e colaboradores (2004) desenvolveram um método para realizar o controle de qualidade de amostras comerciais “Catuaba” (*Anemopaegma arvense* Juss. Bignoniaceae X *T. catigua*). Os autores utilizaram uma tintura hidroalcoólica das cascas de *T. catigua* padrão para a obtenção de um perfil cromatográfico por CLAE empregando: coluna Hyperisil C18 (15 x 0,45 cm) e como eluente, um sistema gradiente de água:metanol e detecção ultravioleta acoplado ao espectrômetro de massas (EM). As análises dos

cromatogramas demonstraram que as três amostras comerciais de "Catuaba" pertencem à espécie *T.catigua*.

Beltrame e colaboradores (2006) também desenvolveram um método para a quantificação de cinchonaína Ib para ervas medicinais comercializadas como Catuaba no Brasil. O extrato hidroalcoólico preparado a partir das cascas *T.catigua* foi avaliado por meio de CLAE usando um detector de arranjo de diodos.

Um método espectrofotométrico para quantificação dos fenóis totais das cascas de *T. catigua* também foi desenvolvido para controlar a qualidade das drogas vegetais (RABELO et al., 2013).

Para avaliação da qualidade de *T.catigua*, Longhini e colaboradores (2013) desenvolveram e validaram um método por CLAE com detecção de arranjo de diodos para a quantificação simultânea de compostos fenólicos: procianidina B2, epicatequina, chinchonaínas Ia, Ib, IIa, IIb, catequina, e ácido clorogênico. Um sistema cromatográfico adequado foi selecionado, utilizando colunas Gemini C18 e Luna PFP (2) e como fase móvel um sistema gradiente com metanol: acetonitrila e água (75:25; v,v) contendo 0,05% de ácido trifluoracético (TFA).

Lonni e colaboradores (2012) realizaram desenho estatístico da mistura de água, metanol, acetona e etanol para extrair o material das cascas de *T. catigua*. Os autores realizaram análise por CLAE-DAD das misturas. Na mistura de acetona-metanol-água-etanol (1:1:1:1; v/v), verificaram a presença de cinchonaínas, derivados de ácido gálico, polifenóis, flavonoides, catequinas e epicatequinas. Este estudo indicou que as misturas quaternárias com proporções similares aos solventes, resultaram em maiores rendimentos do extrato bruto, de polifenóis totais e maior capacidade antioxidante.

2.2 ASPECTOS QUÍMICOS

2.2.1 Substâncias fenólicas

Substâncias fenólicas constituem um extenso grupo de metabólitos secundários amplamente distribuídos nas plantas, são derivados da fanilalanina e tirosina. Incluem moléculas simples à moléculas com alto grau de polimerização. Podem ser encontrados na forma livre ou ligados a proteínas e açúcares. Geralmente são formados sob condições de estresse vegetal, como contaminações por patógenos, radiação UV, fermentos, entre outros (BRAVO, 1998; NACZK & SHAHIDI, 2004).

A estrutura química básica possui um anel aromático, com pelo menos um grupamento hidroxila. São formados pela rota biossintética do ácido chiquímico e via acetato-malonato. São classificadas em fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas,

flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (CARVALHO et al., 2007; SOUSA et al., 2007).

Possuem atividade antioxidante, antiviral, antifúngica e antibacteriana. Nos vegetais, auxiliam na proteção contra herbívoros e insetos e possuem atividade alelopática. Também contribuem para coloração, odor e sabor das plantas, sendo utilizados como flavorizantes em nível industrial (PROENÇA da CUNHA et al., 2003; CARVALHO et al., 2007).

A estrutura química e propriedades redutoras condicionam a atividade antioxidante, sequestrando radicais livres e quelando metais de transição, impedindo também a propagação do processo oxidativo. Os produtos formados pela ação antioxidante são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático dos fenólicos (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; CHUN et al., 2005).

O método mais utilizado para quantificação de fenóis totais faz uso do reagente de Folin-Ciocalteu, que formam um complexo de intensa coloração na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, permitindo a quantificação (IKAWA et al., 2003; NACZK & SHAHIDI, 2004).

2.2.2 Taninos

A palavra tanino foi utilizada pela primeira vez por Seguin, em 1796, para definir o princípio adstringente da casca de carvalho que possuía a propriedade de combinar com as proteínas da pele dos animais e torná-la imputrescível e resistente à água fervente (COSTA, 2002). Foram definidos por Bate-Smith e Swain, em 1957, como compostos fenólicos solúveis em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Daltons e por apresentar capacidade de precipitar alcaloides, gelatina e outras proteínas (HASLAM, 1989; HASLAM, 1996; SANTOS & MELLO, 2004).

Os taninos são classificados de acordo com sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (COSTA, 2002; SANTOS & MELLO, 2004).

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos fenólicos, geralmente de ácido gálico e de outros relacionados. Consideram-se os subgrupos dos galotaninos e dos elagitaninos (KHANBABAEE, 2001; COSTA, 2002).

Taninos condensados também são chamados de proantocianidinas. Eles são muito mais resistentes à hidrólise, formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (SANTOS & MELLO, 2004).

A ocorrência dos taninos condensados e hidrolisáveis segue padrões diferentes. Enquanto os taninos hidrolisáveis estão praticamente restritos às Choripetalae e das dicotiledôneas, os taninos condensados ocorrem em gimnospermas e angiospermas (SANTOS & MELLO, 2004).

De acordo com Haslam (1996), acredita-se que as propriedades farmacológicas dos taninos devem-se pelo menos a três características gerais que são comuns, em maior ou menor grau, aos dois grupos, condensados e hidrolisáveis: complexação com íons metálicos (ferro, cobre, manganês, alumínio, alumínio, entre outros); atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; e habilidade de complexação com proteínas e polissacarídeos.

A maior parte das propriedades biológicas dos taninos está relacionada à possibilidade de formar complexos com macromoléculas, como o caso das proteínas (enzimas digestivas, proteínas digestivas, proteínas fúngicas ou virais). As ligações podem ser de natureza reversível ou irreversível (CUNHA et al., 2003).

O uso clínico dos taninos, embora reduzido, deriva da sua afinidade para os compostos proteicos. Internamente têm efeito antidiarreico, já por via externa exercem efeito impermeabilizante e vasoconstritor sobre os capilares superficiais, limitando a perda de fluidos e impedindo agressões extrínsecas. Possuem ação antisséptica (antibacteriana e antifúngica) favorecendo a regeneração dos tecidos no caso de feridas ou queimaduras (CUNHA et al., 2003). Podem ser utilizados também para tratamentos de reumatismo, hemorragia, problemas renais e do sistema urinário, processos inflamatório em geral, entre outros (SANTOS & MELLO, 2004).

2.2.2.1 Taninos condensados

Taninos condensados são metabólitos secundários derivados do chiquimato, estão amplamente distribuídos em plantas lenhosas. Esta classe de compostos também pode ser denominada de proantocianidinas, pois após a degradação dos taninos condensados com ácido mineral diluído a quente, produzem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, tais como cianidina e delphinidina (SANTOS & MELLO, 2004).

Os taninos condensados podem apresentar-se como oligômeros ou polímeros polihidroxilados, formados por unidades de catequina e/ou epicatequina com ligações 4→6 ou 4→8 (figura 6). Sendo que os acoplamentos 4→8 são os mais favorecidos estereoquimicamente (SCHOFIELD et al., 2001; KHANDABABAE & VAN REE, 2001; TOLEDO, 2002; QUEIROZ, 2002).

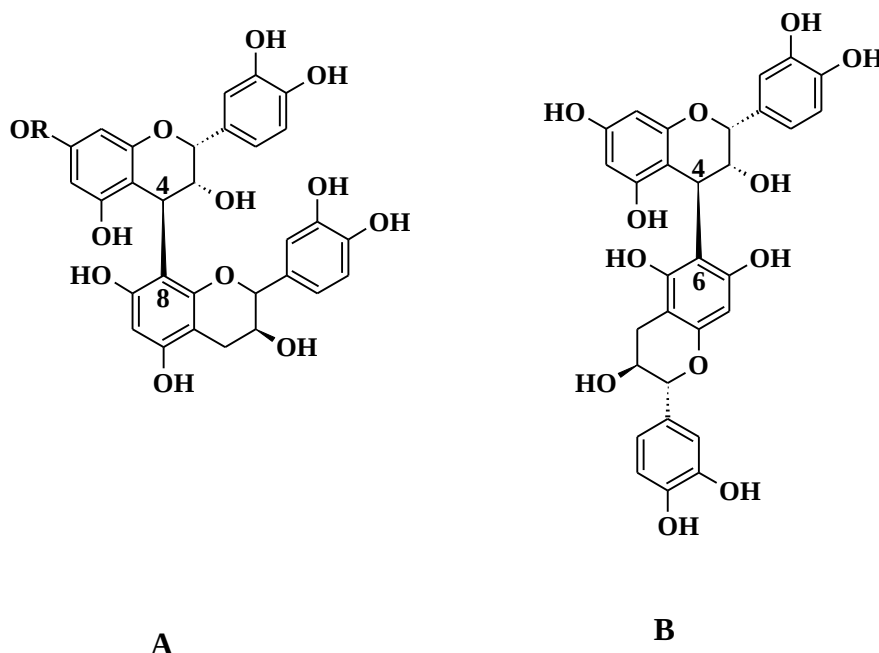


Figura 6 - Exemplos de proantocianidinas diméricas (A- epicatequina-(4 β →8)-catequina; B- epicatequina-(4 β →6)-catequina).

Proantocianidinas estão presentes em plantas como misturas complexas de polímeros com um grau médio de polimerização entre 4 e 11. As fontes de alimentos que apresentam predominância de taninos condensados são vinho tinto, chá, chocolate e frutas como uva, maçãs e peras (SCALBERT & WILLIANSO, 2000).

São classificados de acordo com seu padrão de hidroxilação em vários subgrupos, incluindo procianidina, prodelfinidina, propelargonidina, profisetinidina, prorobinetinidina, proguibourtinidina, proteracacinidina e promelacacinidina (quadro 1, figura 7) (COS et al., 2004; SANTOS & MELLO, 2004).

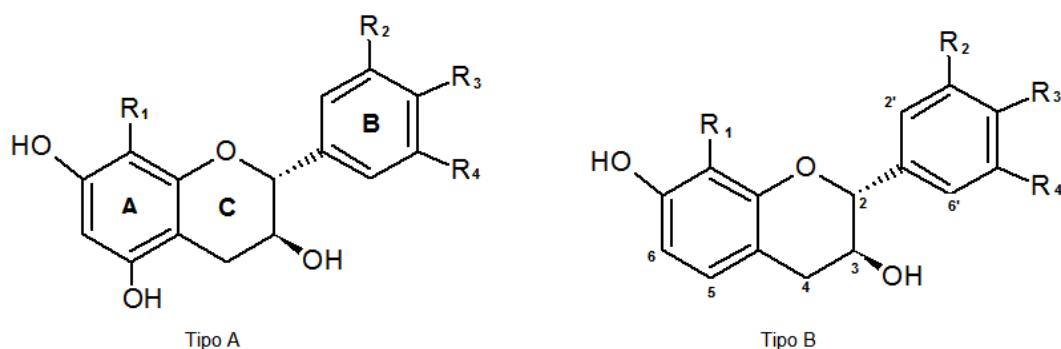


Figura 7 - Estruturas dos monômeros básicos de taninos condensados. Fonte: SANTOS & MELLO, 2004.

Quadro 1 - Grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos de taninos condensados.

Fonte: SANTOS & MELLO, 2004.

Tipo	Proantocianidina	Monômero Nome trivial	Substituinte			
			R1	R2	R3	R4
A	Prodistenidina	Distenina	H	H	H	H
	Properlargonidina	Afzelequina	H	H	OH	H
	Procianidina	Catequina	H	OH	OH	H
	Prodelfinidina	Galocatequina	H	OH	OH	OH
	Proguibourtinidina	Guibourtinidol	H	H	OH	H
	Profiseinidina	Fisetinidol	H	OH	OH	H
B	Probinetinidina	Robinetinidol	H	OH	OH	OH
	Proteracacinidina	Ortina	OH	H	OH	H
	Promelacacinidina	Mesquitol	OH	OH	OH	H

As proantocianidinas apresentam várias atividades como: antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antiúlcera, antidiarreico, antiviral, antimicrobiana sobre *Helicobacter pylori* e efeitos cardiovasculares (HASLAM et al., 1996; DE BRUYNE et al., 1999; SANTOS & MELLO, 2004; PASTENE et al., 2009b).

De acordo com Cunha e colaboradores (2003) estudos demonstraram as potencialidades dos taninos, particularmente as proantocianidinas oligoméricas, na inibição da peroxidação lipídica, como bloqueadores de radicais livres e da formação do íon peróxido. Estes estudos destacaram a importante contribuição das procianidinas oligoméricas em uma terapêutica similar a flavonoides.

2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DE *Trichilia catigua*

Estudo realizado por Vaz e colaboradores (1997) demonstrou o efeito antinociceptivo do extrato hidroalcoólico da catuaba no modelo experimental de contração abdominal induzida por ácido formalina. Esta atividade farmacológica foi confirmada por Viana e colaboradores (2011) utilizando modelos experimentais de placa de aquecimento, contração abdominal induzida por ácido acético e hiper nocicepção induzida por carragenina.

Calixto e Cabrini (1997) investigaram a ação vasodilatadora do extrato hidroetanólico de *T.catigua* e comparou com a ação acetilcolina. O experimento foi realizado em anéis da aorta torácica de ratos e em artéria pulmonar e mesentérica de coelhos, pré-contraídas com noradrenalina ou fenilefrina. O extrato da catuaba apresentou efeito vasorelaxante da aorta de ratos nas concentrações entre 1 a 3000 µg/ml.

Um estudo utilizando catuaba foi realizado para investigar o relaxamento do corpo cavernoso isolado de coelhos. O extrato provocou um efeito de relaxamento dose dependente de longa duração. O relaxamento produzido não foi significativamente inibido pela infusão de 10 µm de *N*-nitro-Larginina metil éster, o inibidor da síntese de óxido nítrico. A infusão de 10 µm de inibidor solúvel da guanilatociclase reduziu em mais de 50% o relaxamento induzido pelo extrato. O extrato hidroetanólico de *T.catigua* (1-100 mg) não causou aumento significativo da liberação do nucleotídeo AMP cíclico acima dos níveis basais. Sendo assim, o efeito relaxante do extrato em corpo cavernoso isolado de coelho não parece ter relação com a liberação de óxido nítrico (ANTUNES et al., 2001). O que também foi verificado por Kletter et al. (2004).

Pizzolatti e colaboradores (2002a) verificaram a atividade citotóxica da fração diclorometano e aquosa do extrato etanólico da catuaba contra formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Além disso, o mesmo grupo avaliou a atividade antimicrobiana das flavolignanas, cinchonaínas Ia e Ib, isoladas da fração acetato de etila das cascas de *T. catigua*. Estas flavolignanas apresentaram atividade antibacteriana sobre *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (PIZZOLATTI et al., 2002b).

A atividade inseticida a partir do extrato orgânicos dos frutos de *T. eleganse* das sementes de *T. catigua* foi avaliada sobre *Spodoptera frugiperda*, uma das principais pragas da cultura do milho. Os extratos hexânico e metanólico dos frutos *T. elegans* apresentaram forte atividade inseticida, enquanto os extratos hexânico, metanólico e hidrometanólico de sementes de *T. catigua* apresentaram mortalidades larvais moderadas (MATOS et al., 2009).

Barbosa e colaboradores (2004) verificaram que o extrato hidroalcóolico da casca da *T. catigua* na concentração de 120 µg/ml inibe a atividade de plaquetas fosfolipase A2, assim sugerem-se propriedades antiinflamatórias. Isto pode ser explicado devido às drogas que inibem plaquetas fosfolipase A2 (PLA₂), bloqueiam as vias metabólicas das enzimas ciclo-oxigenases na cascata do ácido araquidônico (AA), podendo ser efetivas no tratamento dos processos inflamatórios.

Campos e colaboradores (2005) avaliaram possíveis efeitos antidepressivos em duas espécies de roedores (ratos e camundongos), utilizando o método *in vivo* (teste do nado forçado) e *in vitro* (recaptação da monoamina e liberação em preparações sinaptossomais) com extrato hidroalcoólico da catuaba. O tratamento oral agudo com o extrato produziu

efeitos antidepressivos no modelo da natação forçada em ambas espécies de roedores. Na atividade *in vitro* em preparações sinaptossomais no cérebro de rato o extrato de catuaba inibiu a absorção e aumentou a liberação da serotonina de forma dose dependente.

Tang e colaboradores (2007) investigaram atividade antioxidante das substâncias isoladas e identificadas da *T. catigua*: catiguanina A, catiguanina B, cinchonaínasla, Ib, Ic e Id. Estas substâncias apresentaram atividade no teste de eliminação de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), com valores de IC₅₀ na faixa de 2,3-9,4 µg. O extrato bruto acetona:água (7:3; v/v) e os compostos isolados (epicatequina, procianidinas B2, B4 e C1, cinchonaínasla, Ib, IIb e IIa) também demonstraram capacidade antioxidante *in vitro*, utilizando as técnicas de sequestro do DPPH e redução do ferro (RESENDE, 2007; RESENDE et al., 2011).

Kamdern e colaboradores (2012a) verificaram que o extrato etanólico e as frações butanólica, acetato de etila e diclorometano das cascas de *T. catigua* apresentam atividade antioxidante *in vitro* em diferentes modelos biológicos e químicos. Os autores sugerem que esta atividade pode ser atribuída em partes aos flavonoides e compostos fenólicos presentes nos extratos de plantas.

Foi realizado um estudo para avaliação pré-clínica dos extratos acetônicos de *T. catigua* sobre o sistema nervoso central de ratos. Verificou-se que a fração acetato de etila apresentou efeito antidepressivo e uma melhora na memória dos camundongos. Observa-se também que esta fração apresentou significativa atividade antioxidante *in vitro*. A atividade antioxidante da fração acetato de etila, bem como os seus efeitos farmacológicos podem estar relacionadas com a presença de polifenóis e taninos (CHASSOT et al., 2011).

Bonassoli e colaboradores (2012) demonstraram que a administração subcrônica de 400 mg/kg da fração acetato de etila de *T. catigua* em ratos Swiss promoveu efeitos antidepressivos e contribuíram para o aumento da proliferação de células do hipocampo em camundongos. Os modelos experimentais utilizados foram o teste de natação forçada e ensaio de suspensão da cauda.

Kamdern e colaboradores (2012b) investigaram as propriedades neuroprotetoras do extrato etanólico de *T. catigua* em fatias de hipocampo dos ratos submetidas a 2 h de privação de oxigênio glicose (POG) seguido por 1 h de reperusão. Os resultados indicaram que a planta deve ser usada como preventivo e não como um agente de cura contra danos cerebrais. Os autores sugeriram que o efeito protetor do extrato *T. catigua* pode ser o resultado da ação sinérgica de compostos deste extrato da planta.

Os efeitos da catuaba também foram avaliados sobre o sistema reprodutor de ratos machos e fêmeas, bem como alterações de comportamento após tratamento diário com 400 mg/kg de extrato bruto. Os pesquisadores verificaram que o extrato de *T. catigua* não resultou em variações comportamentais nos ratos, porém pode apresentar toxicidade ao

embrião durante as primeiras etapas de gestação, e não demonstrou alterações significativas no sistema reprodutor dos machos (SANTOS et al., 2015).

Estudos realizados por Espada e colaboradores (2015) verificaram que o extrato bruto e as frações aquosa e acetato de etila das cascas de *T. catigua*, interferiram na fase inicial da replicação do poliovírus tipo 1 e apresentaram efeito sinérgico comparável ao aciclovir para Herpes Simplex tipo 1, em células HEp-2, demonstrando que os extratos são promissores ao desenvolvimento de drogas antivirais.

2.4 MICRO-ORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO

2.4.1 *Helicobacter pylori*

A *Helicobacter pylori* foi isolada pela primeira vez da mucosa gástrica do ser humano, em 1982, por Barry Marshall e Robin Warren, dois pesquisadores australianos. Esta bactéria originariamente foi denominada como OGLO (*gastric Campylobacter like organism*). Após recebeu os nomes de *Campylobacter pyloridis*, *C. pyloricus* e *C. pylori*, e em 1989 recebeu o nome definitivo de *Helicobacter pylori* (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). No ano de 2005, Marshall e Warren receberam o prêmio Nobel em medicina pela descoberta da bactéria e sua associação a úlceras pépticas e gastrite (THE NOBEL PRIZE, 2005).

Helicobacter pylori é uma bactéria Gram-negativa, espiralada, microaerofílica e com extremidades arredondadas nas biópsias gástricas (GOODWIN et al., 1987; DUNN et al., 1997). Este micro-organismo infecta a mucosa gástrica aproximadamente da metade da população do mundo e tem sido associado a uma série de doenças com significativa morbidade e mortalidade (DUNN et al., 1997; AGUILAR et al., 2001; VALLSTRÖM, 2009).

Os principais fatores de virulência da *H. pylori* são a urease, citotoxina vacuolar VacA e citotoxina associada ao gene (CagA). Deste modo, os indivíduos infectados com estirpes que expressam esses fatores de virulência provavelmente desenvolvem uma grave inflamação (DUNN et al., 1997; AGUILAR et al., 2001).

Esta infecção progressivamente ocasiona uma inflamação da mucosa gástrica levando todos os indivíduos infectados ao desenvolvimento do quadro de gastrite, embora normalmente clinicamente assintomáticos. O progresso em direção à gastrite superficial crônica caracteriza-se por infiltração de neutrófilos, células B, células T, linfócitos, macrófagos e células plasmáticas. Cerca de 10-20% dos indivíduos infectados pela *H. pylori* desenvolvem úlcera péptica, sendo 1 a 2% câncer gástrico (VALLSTRÖM, 2009).

A terapia tripla (amoxicilina, claritromicina e um inibidor da bomba de prótons) ou a terapia quádrupla (amoxicilina, claritromicina, inibidor da bomba de prótons e bismuto) têm sido recomendada como tratamento (MALFERTHEINER, 1997; MÉGRAUD, 2004;

COELHO & ZATERKA, 2005). No entanto, este tratamento pode falhar por várias razões, principalmente a resistência da *H. pylori* a um dos antibióticos utilizados (MÉGRAUD, 2004).

Assim, levando em consideração as elevadas taxas de resistência de *H. pylori* aos antibióticos, insurge a necessidade na busca de novas alternativas de tratamento (MÉGRAUD, 2004).

2.4.2 *Enterococcus faecium*

O gênero *Enterococcus* é composto de micro-organismos Gram-positivos encontrados isolados, em pares ou cadeias curtas. Não formam esporos, são anaeróbios facultativos e catalase negativa (TEIXEIRA & MERQUIOR, 2013). São comuns no trato gastrointestinal de seres humanos e animais, apesar de causarem infecções, são considerados como agentes patogênicos secundários. Seu representante mais comum é o *Enterococcus faecalis*, no entanto, o número de infecções sistêmicas por *E. faecium* têm crescido (TIMMERS et al., 2002; MURDOCH et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2002).

Nas últimas 2 décadas, *E. faecium* emergiu como um patógeno multi-resistente nosocomial causando bacteremia, endocardite, infecções no trato urinário, entre outros. *E. faecium* é intrinsecamente resistente a vários antibióticos clinicamente importantes e adquiriu recentemente resistência a vancomicina, a daptomicina, e linezolida (ARIAS & MURRAY, 2012). Estão presentes em níveis relativamente baixos em seres humanos saudáveis, porém podem se tornar proeminentes em pacientes internados, presumivelmente como consequência da terapia antimicrobiana, que altera a microbiota normal do intestino, provendo um ambiente adequado à proliferação dessa bactéria (GILMORE & FERRETTI, 2002; BRANDL et al., 2008; UBEDA et al., 2010; PALMER & GILMORE, 2010).

No passado, as infecções enterocócicas hospitalares eram predominantemente causadas por *E. faecalis*, porém desde 1990 o número de casos de *E. faecium* tem aumentado, sendo atualmente tão comuns quanto o *E. faecalis* (HIDRON et al., 2008). Um importante fator para o aumento das infecções por essa bactéria é a capacidade de adaptação, incluindo elementos genéticos que determinam a resistência aos antibióticos (GALLOWAY-PEÑA et al., 2009).

E. faecium resistente a vancomicina (EFRV) foi primeiramente reportado em unidades hospitalares em 1980. Tal resistência é tipicamente mediada pelos genes VanA e VanB (ARTHUR et al., 1996; WILEMS et al., 2005). Durante a última década, EFRV tem emergido como um importante fator de infecções nosocomiais, especialmente em pacientes imunocomprometidos, sendo de difícil tratamento gerando endemias em muitos hospitais dos Estados Unidos e alguns países da Europa (GRAYSON et al., 1991; MURRAY, 2000; LEAVIS et al., 2003).

2.4.3 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* foi primeiramente isolada em 1885 por Theodor Escherich, no qual foi denominada primeiramente de Bactéria coli (ESCHERICH & BETTELHEIM, 1988). O nome *Escherichia coli* foi reconhecido somente em 1954 (COWAN, 1954). É um micro-organismo comensal do trato gastrointestinal, entretanto é patogênico aos demais sítios do organismo, principalmente trato urinário, corrente sanguínea e sistema nervoso central (KAPER et al., 2004; COXEN & FINALY, 2010).

E. coli é uma bactéria Gram negativa de forma esférica e oxidase negativa, pertencente a família Enterobacteriaceae. Cresce preferencialmente a 37°C tanto em condições aeróbias como anaeróbias, sendo facilmente isolada de amostras fecais (NATARO & KAPER, 1998; WAG et al., 2003; DEBROY et al., 2011).

2.4.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas são bacilos Gram negativos aeróbios não fermentadores, comuns ao solo, água e ambientes úmidos. A espécie mais frequente associada a doenças em seres humanos é a *Pseudomonas aeruginosa*, agente patogênico oportunista, que causa infecções em praticamente todos os tecidos em pacientes imunodeficientes. Possui resistência inata a diversos agentes antimicrobianos (GREENWOOD et al., 2007; KERR & SNELLING, 2009).

É o patógeno causador de pneumonia nosocomial mais comum nos Estados Unidos (GAYNES & EDWARDS, 2005; STREIT et al., 2004; HIDRON et al., 2008). Os índices de infecções por micro-organismos Gram negativos resistentes continuam a subir em todo o mundo e as opções de tratamento estão cada vez mais limitadas. A *P. aeruginosa* apresenta resistência principalmente devido à baixa permeabilidade da parede celular e bomba de efluxo (LAMBERT, 2002; TAM et al., 2010; BREIDENSTEIN et al., 2011).

2.4.5 *Staphylococcus aureus*

Os *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, catalase positivos, imóveis, não esporulados. Apresentam-se de forma isolada, pares ou cadeias. Foram descritos pela primeira vez em 1880 pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston e atualmente é um dos micro-organismos mais comuns (KONEMAN et al., 2001; CASSETARI et al., 2005; TRABULSI & ALTHERIUM, 2005).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcae, possui 33 espécies. Geralmente fazem parte da microbiota normal do ser humano. A espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial, é o *S. aureus* (KONEMAN et al., 2001; CASSETARI et al., 2005).

S. aureus é uma das principais causas de bacteremias e endocardite infecciosa, bem como osteoarticular, pele e tecidos moles, pleuropulmonar e infecções relacionadas a dispositivos médicos (WERTHEIM et al., 2005; HOWDEN et al., 2010).

2.4.6 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis é uma bactéria não patogênica Gram positiva, aeróbia, comumente encontrada no solo, água e em plantas. Constituem uma importante fonte de produção de enzimas com interesse industrial, como amilases e proteases em grandes quantidades, bem como a produção de antibióticos. Também é muito utilizada na produção de grãos fermentados de soja, na culinária típica japonesa (HARWOOD, 1992).

São capazes de formar esporos latentes, fazendo com que sejam resistentes a condições extremas, podendo ser facilmente armazenados (PIGGOT & HILBERT, 2004). Também são capazes de produzir uma variedade de compostos biologicamente ativos e biofilmes, sendo úteis como agente de controle biológico. (BRANDA et al., 2001; HAMON & LAZAZZERA, 2001; BAIS et al., 2004).

2.4.7 Gênero *Candida*

Com o aumento na população de indivíduos imunocomprometidos, infecções fúngicas tornaram-se um problema crescente. A complexidade de diagnóstico e a resistência a medicamentos são de grande preocupação, pois a disponibilidade de fármacos para o tratamento é bem menor quando comparado a infecções bacterianas e virais (BLANCO & GARCIA, 2008; MICHELI & LEE, 2011).

Infecções fúngicas podem originar várias doenças, sendo elas locais, superficiais, alérgicas ou sistêmicas, sendo esse último particularmente grave (RICHARDSON, 2005).

A mortalidade associada a infecções fúngicas em adultos é em média de 14,5 a 49%, sendo que a *Candida albicans* é responsável por cerca de 50% dos casos das candidemias (PERLROTH et al., 2007; PFALLER & DIEKEMA, 2007).

A incidência de infecções fúngicas graves tem aumentado desde 1980, especialmente em pacientes imunocomprometidos, hospitais, neonatos e idosos (ARENDRUP et al., 2005; ESPINEL-INGROFF et al., 2009).

Pertencentes a família Candidaceae, os fungos do gênero *Candida* podem ser encontrados em plantas, no solo, ambientes aquáticos e animais. Mais de 200 espécies do gênero já foram relatadas, sendo que cerca de 20 são considerados agentes etiológicos de várias patogenias em humanos (NGUYEN et al., 2007; PFALLER et al., 2007; WANG et al., 2008; BOUZA & MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; CHEN et al., 2009; HA et al., 2010; NUCCI et al., 2010).

São micro-organismos encontrados na forma leveduras, podendo apresentar formas filamentosas (pseudohifas ou hofas verdadeiras). As infecções são normalmente

endógenas, mas também pode ocorrer transmissão por contato ou relações sexuais (COL et al., 2009). São encontrados na mucosa oral, gastrointestinal e vagina, fazendo parte da microbiota normal do ser humano (SHAO et al., 2007).

Dentre os 20 agentes etiológicos, 5 são considerados responsáveis por mais de 95% das infecções, sendo eles: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (TORTORANO et al., 2006; FALAGAS et al., 2010; HA et al., 2010; NUCCI et al., 2010).

Entre os fatores que contribuíram para o aumento das candidemias, destacam-se o aumento no número de pacientes imunocomprometidos que fazem uso de cateteres e nutrição parenteral, quimioterapia, transplantes, utilização de antibióticos de amplo espectro, AIDS, entre outras. Os micro-organismos do gênero *Candida* são considerados como os principais causadores de infecções nosocomiais em todo o mundo (ORTEGA et al., 2011).

A patogenicidade dos fungos dessa espécie é atribuída aos fatores de virulência, como adesão, formação de biofilme, tubo germinativo e a produção de enzimas hidrolíticas que danificam os tecidos, como proteases, fosfolipases e hemolisinas (SILVA et al., 2011b).

As espécies *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são de particular importância no Brasil, pois a frequência de isolamento de ambas são bem próximas, variando de acordo com a região do país. Ambas são consideradas como as segundas espécies mais frequentemente isoladas, sendo que em alguns chegam a ultrapassar a *C. albicans*, fungo de maior prevalência (COLOMBO et al., 2006; HINRICHSSEN et al., 2008; ROTA, 2009; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010).

C. albicans é um fungo dimórfico, que cresce como levedura à 30°C e na forma filamentosa ou hifas à 37°C. São geralmente encontradas na epiderme sob a forma de leveduras, enquanto que a *C. albicans* patogênica na derme e órgãos sistêmicos existem predominantemente como pseudohifas (GOW et al., 2012).

Estima-se que cerca de 75% das mulheres sofreram pelo menos um episódio de candidíase vulvo vaginal na vida (SOBEL, 2007). Apesar da frequência e morbidade associadas, infecções superficiais por *C. albicans* não são letais (PFALLER & DIEKEMA, 2010).

Candida albicans é um fungo oportunista que faz parte da microbiota normal do ser humano, pode permanecer no trato gastrointestinal por longos períodos de tempo na forma não patogênica. No entanto, alterações no sistema imune e na microbiota normal do hospedeiro podem causar aumento da proliferação, levando ao desenvolvimento de patogenias. É considerada a espécie de maior prevalência em infecções fúngicas (RUIZ-SANCHEZ et al., 2002).

Para o estabelecimento da infecção, a *C. albicans* utiliza várias estratégias para driblar o sistema de defesa do hospedeiro, como a produção de adesinas, formação de hifas e a secreção de enzimas hidrolíticas (TSAI et al., 2013).

A *C. tropicalis* é uma levedura ascomiceta diploide oportunista que coloniza vários locais anatomicamente distintos como pele, trato gastrointestinal, geniturinário e também respiratório (BIASOLI et al., 2002; BASU et al., 2003; OKSUZ et al., 2007).

A *C. tropicalis* é uma das três espécies não *Candida albicans* mais comumente isoladas. Estudos epidemiológicos realizados em 12 unidades de saúde do Brasil apontaram como a segunda mais frequente, sendo responsável por 33 a 48% dos casos de candidemias, especialmente em pacientes cateterizados, que fizeram uso de antibióticos de amplo espectro ou com câncer (COLOMBO et al., 2007; MIRANDA et al., 2009; PAHWA et al., 2014).

Essa espécie tem a habilidade rápida de desenvolver resistência ao fluconazol, sendo que o aumento do uso desse medicamento é considerado como um dos responsáveis pelo crescente, e preocupante, aumento de candidemias causadas por *C. tropicalis* (YANG et al., 2004; GIRI & KINDO, 2012).

Vários fatores de virulência são responsáveis pelas infecções causadas por *C. tropicalis*, entre eles a habilidade de aderência e formação de biofilme em dispositivos médicos e a produção de proteinases (NEGRI et al., 2011; DEORUKHAR et al., 2014).

A espécie *C. parapsilosis*, da mesma forma que as anteriormente citadas, também é comensal ao ser humano, sendo mais frequentemente isolada das mãos e trato gastrointestinal. A presença desse fungo nas mãos contribui para infecções horizontais, principalmente em unidades de terapia intensiva de neonatos (SAIMAN et al., 2001; LUPETTI et al., 2002; BONASSOLI et al., 2005; HERNANDEZ-CASTRO et al., 2010).

As infecções causadas por *C. parapsilosis* correspondem a um terço das infecções por *Candida* em neonatos, com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 10%. As razões para a predileção dessa espécie em neonatos não são claras, mas a formação de biofilme e adesão a materiais hospitalares podem ser determinantes (PAMMI et al., 2014).

2.4.8 Fungos dermatófitos

Dentre as infecções fúngicas, as micoses cutâneas são as mais comuns, sendo causadas principalmente por fungos dermatófitos. Tais fungos são classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, sendo também divididos em zoofílicos, geofílicos e antropofílicos. Cerca de 30 espécies de dermatófitos já foram identificadas em humanos (WHITE et al., 2008).

A transmissão ocorre através de contato direto com indivíduos ou animais contaminados e também de forma indireta. As infecções são normalmente superficiais e de sintomas brandos, principalmente na pele e unhas. Geralmente não ocorre penetração desses fungos em tecidos e órgãos internos, porém, em pacientes imunocomprometidos

pode haver infecção profunda com formação de granulomas (DEGREEF, 2008; RODWELL et al., 2008).

Estima-se, segundo a Organização Mundial de saúde, que os dermatófitos afetam 25% da população mundial, sendo que de 30 a 70% dos adultos são portadores assintomáticos (SEEBACHER et al., 2008).

O tratamento de infecções fúngicas causadas por dermatófitos é geralmente longo e oneroso, o que diminui a taxa de adesão dos pacientes. Os principais fármacos utilizados pertencem à classe das alilaminas e azóis (GUPTA & COOPER, 2008).

Trychophyton rubrum é o principal fungo causador de dermatofitoses, principalmente em casos de tinea corporis. É um agente oportunista que causa infecções geralmente em pacientes com hipercortisolismo (DIAS et al., 2013; SENA et al., 2015). *T. mentagrophytes* é responsável por cerca de 10% dos casos, sendo o segundo mais frequente, geralmente provoca onicomicoses, tinea pedis, tinea corporis e também está relacionado com problemas dermatológicos em animais (VENA et al., 2012).

Microsporum gypseum é um fungo dermatófito zoofílico, associado à tinea capitis e corporis em seres humanos. É menos frequentemente isolado que as demais espécies citadas anteriormente, sendo principalmente relacionado à alopecia e descamação da pele de animais. A infecção em seres humanos ocorre normalmente por contato com o solo contaminado com esporos do fungo (KANO et al., 2001; ZHANG et al., 2002; ROMANO et al., 2005; HAVLICKOVA et al., 2008; ARIDOGAN et al., 2011).

2.5 ELETROFORESE CAPILAR

Métodos analíticos são ótimas ferramentas para controle de qualidade e avaliação da autenticidade de formas farmacêuticas e matérias-primas vegetais.

A eletroforese foi primeiramente descrita por Tiselius na década de 30, que definiu a técnica como a migração de espécies eletricamente carregadas em um condutor líquido, sob a ação de um campo elétrico. Tal técnica foi denominada “eletroforese de fronteira móvel” é largamente utilizada na separação de biomoléculas (TAVARES, 1996).

Atualmente, a separação de substâncias em técnicas de eletroforese se dá por diferenças de mobilidades eletroforéticas, partição de fase, pH, tamanho molecular, ou a combinação de uma ou mais dessas propriedades (KVASNICKA, 2007).

A eletroforese capilar foi implementada nos anos 80 como um método de análise e separação de substâncias, complementando técnicas clássicas como CLAE e CG, e teve rápido avanço decorrido da relativa simplicidade instrumental, da variedade de formas de separação e diversidade de compostos passíveis de análise (RIGHETTI & HANCOCK, 1995; PREINERSTORFER et al., 2009).

A técnica utiliza um capilar de sílica fundida, preenchido com solução eletrolítica, onde as extremidades do capilar encontram-se imersas em reservatórios contendo eletrólito, onde também são inseridos eletrodos de platina conectados a alta tensão, para aplicação de diferentes potenciais. Os detectores comumente utilizados são por absorvância (UV), EM e fluorescência induzida por laser. A vantagem de EC em relação a outros métodos analíticos é a maior resolução e eficiência, com um tempo menor de análise e a aplicação de volumes menores de amostra (1-10 nL) e solução eletrolítica de trabalho (TAVARES, 1997; MELLO & ITO, 2011).

Entre as técnicas comumente utilizadas em EC, destacam-se a eletroforese capilar de zona (ECZ), cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), eletrocromatografia capilar (CEC), isotacoforese capilar (CITP), eletroforese capilar em gel (CGE) e focalização isoeletrica capilar (CIEF), sendo que as duas primeiras são as técnicas mais utilizadas (SUNTORN SUK, 2002; SILVA et al., 2007; SUNTORN SUK, 2010).

A ECZ destaca-se como o método mais reprodutível e utilizado, devido a sua versatilidade e simplicidade de operação, possuindo também alto poder de separação e sensibilidade (HU & MARTIN, 1999; WANG, 2000; GUTERRES, 2005). A desvantagem dessa técnica é que ela não é capaz de separar analitos neutros. Neste caso aconselha-se a utilização de MEKC, no qual um surfactante com carga é acrescido à solução eletrolítica na concentração micelar crítica, gerando separação pela diferença no grau de partição entre os analitos neutros e as micelas carregadas (WEINBERGER, 1993; TAGLIARO et al., 1998; HU & MARTIN, 1999; LINHARDT & TOIDA, 2002; LUNTE et al., 2002; GUTERRES, 2005).

Além de surfactantes, como no caso de MEKC, seletores quirais como as ciclodextrinas (CDs) podem ser adicionadas ao tampão, a fim de otimizar separações de misturas racêmicas, devido a interações estereoespecíficas entre enantiômeros e as CDs (WEINBERGER, 1993; TAGLIARO et al., 1998; EVANS & STALCUP, 2003).

A técnica de EC ainda se encontra em estágio de desenvolvimento, porém apresenta grande potencial de tornar-se uma ferramenta de rotina nas mais diversas áreas, como clínica, química e biológica (HEEGAARD et al., 1998; TAGLIARO et al., 1998; HU & MARTIN, 1999; LINHARDT & TOIDA, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho objetivou a caracterização química da fração aquosa de *Trichilia catigua*. Concomitantemente, realizou-se a triagem microbiológica do extrato bruto e frações contra bactérias e fungos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir extrato e frações semipurificadas de *T. catigua*;
- Determinar o teor de polifenóis totais e a capacidade antioxidante dos extratos de *T. catigua*;
- Caracterizar a fração aquosa de *T. catigua* por meio de ressonância magnética nuclear;
- Fracionamento da fração aquosa por cromatografia em coluna;
- Desenvolver metodologia por meio de eletroforese capilar para a fração aquosa de *T. catigua*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato bruto e frações acetato de etila e aquosa contra cepas bacterianas e fúngicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

As cascas de *Trichilia catigua* A. Juss foram coletadas em maio 2011, pelo Sr. José Maria Monteiro, na cidade de Caetité, estado da Bahia, Brasil. Uma exsicata está depositada sob o número 19.434 no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUEM).

No Laboratório de Biologia Farmacêutica – Palafito, as cascas foram fragmentadas com o auxílio de tesoura de poda manual e secas à temperatura ambiente. Após essa etapa, as cascas foram colocadas em estufa de circulação forçada de ar aquecido à 40 °C durante 24 h e em seguida foram cominuídas em moinhos de martelos.

4.2 SOLVENTES E REAGENTES

Todos os solventes e reagentes que foram empregados possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.) das marcas Merck®, Sigma®, exceto quando especificado.

- 2,2-difenil-1-hidrazila-picril (DPPH);
- Albumina sérica bovina (BSA);
- Acetato de etila;
- Acetona;
- Ácido ascórbico;
- Ácido bórico;
- Ácido clorídrico;
- Ácido fórmico;
- Ágar triptona de soja (TSA);
- Ágar Miller Hinton;
- Água Ultrapura (Mili-Q)- (Milipore®);
- Butil-hidróxi-tolueno (BHT);
- Caldo Mueller Hinton;
- Carbonato de sódio anidro;
- Claritromicina;
- Cloreto de magnésio;
- Dimetilsulfóxido (DMSO);
- 1,4 Dioxano;
- Dodecilsulfato de sódio (SDS);
- Fosfato de sódio dibásico;
- Fosfato de sódio monobásico;
- Metanol grau HPLC;

- Metil- β -ciclodextrina;
- β -ciclodextrina;
- 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina;
- Penicilina;
- Pirogalol;
- Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu (Dinâmica®);
- Sephadex® LH-20 e G-25;
- Solução salina tamponada com fosfato (pH 7,7);
- Tetraborato de sódio;
- Tetraciclina;
- Trolox®;
- Vancomicina;

4.3 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica Marte®, modelo AY220;
- Balança infravermelha de fonte halógena OHAUS®;
- Banho-maria;
- Câmara contendo lâmpadas UV 254 e 365 nm;
- Cartucho de extração em fase sólida C18 ODS Agilent;
- Cromatofolhas de alumínio em gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck®) de 0,200 mm
- Espectrofotômetro Dt-mini-2-gs®;
- Evaporador rotatório Buchi® R- 114;
- Leitor de Microplacas BioTek;
- Liofilizador Christ® Alpha 1-4;
- Membrana Millipore HAWP01300 0,45 μ m 13 mm
- Moinhos de martelos;
- pHmetro Digimed DM-22;
- RMN Mercury 300BB¹³C 75,5 MHz e ¹H 300,06 MHz;
- Sistema capilar eletroforético Beckman P/ACEMDQ equipado com um detector UV-Vis;
- Ultra-Turrax, modelo UTC115KT.

4.4 PREPARAÇÃO DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO AQUOSA

O preparo do extrato bruto das cascas secas de *Trichilia catigua* e a fração semipurificada aquosa e acetato de etila, foi realizada de acordo com Resende (2007), Chassot et al.(2011), Bonassoli e colaboradores (2012) e Longhini (2013).

As cascas da catuaba pulverizadas foram submetidas à turboextração com 12 l de acetona-água (7:3, v/v) durante 15 min, mantendo a temperatura inferior a 40°C. Os extratos produzidos foram filtrados, concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida e liofilizados fornecendo o extrato bruto (EB). Em seguida, o EB (50 g) foi dissolvido em água (500 ml) e particionado com acetato de etila (1:1, v/v, 12 vezes), obtendo-se assim a fração acetato de etila (FAE) e a fração aquosa (FAQ). As frações orgânica e aquosa foram concentradas, congeladas e liofilizadas.

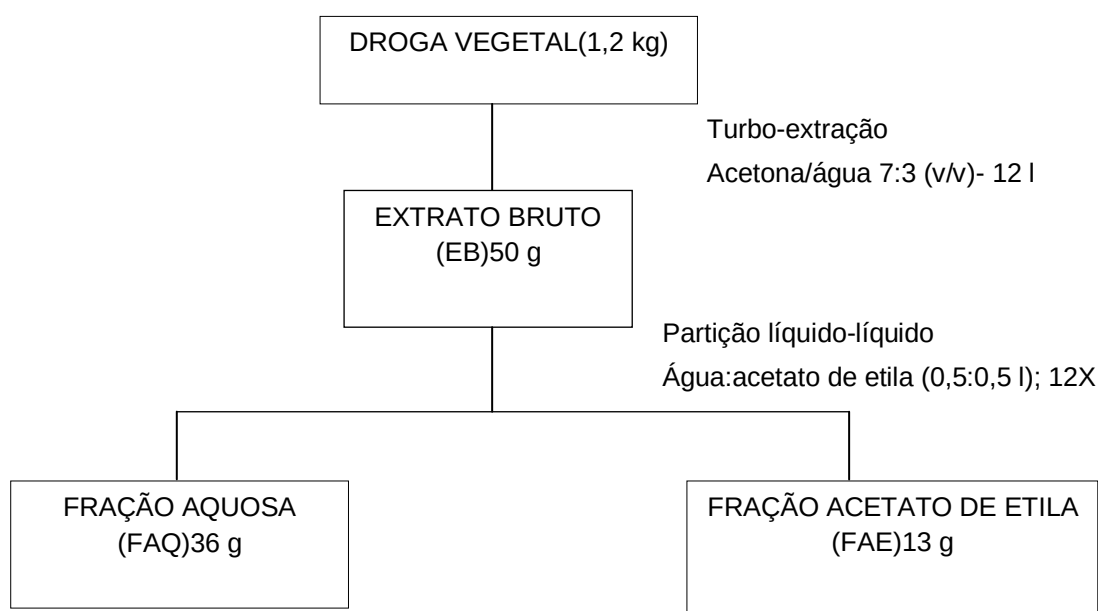


Figura 8 - Fluxograma de preparação de extratos a partir das cascas de *Trichilia catigua*

4.5.1 Determinação do teor de polifenóis totais

A técnica de determinação de polifenóis totais empregada foi a descrita na Farmacopeia Brasileira (2010), com algumas modificações, na qual a droga vegetal foi substituída pelos extratos, de acordo com os resíduos secos obtidos. O procedimento foi realizado para EB, FAE e FAQ nos quais foram pesados, respectivamente, 0,15; 0,04 e 0,10 g.

Os extratos foram transferidos para balão volumétrico de 100 ml, completado com água destilada. A essa solução, deu-se o nome de solução-mãe (SM).

Para a determinação de polifenóis totais (PT), 5 ml da SM foram diluídos com água em balão volumétrico de 25 ml. Dois mililitros desta solução foram transferidos com 1 ml de

reagente fenólico de Folin-Ciocalteu (2 mol/l) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 10,75%. Após 30 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 760 nm, empregando-se a água destilada como branco.

Também procedeu-se a leitura do padrão pirogalol, onde 50 mg de pirogalol foram pesados, transferidos para um balão volumétrico de 100 ml e dissolvidos com água. Desta solução, foram tomados 5 ml e completado para 100 ml com água. Transferiram-se 2 ml dessa solução com 1 ml de reagente fenólico de Folin-Ciocalteu e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 10,75%. A absorvância foi determinada conforme as soluções anteriores.

$$PT = \frac{62,5 \times A1 \times m2}{A3 \times m1}$$

PT= polifenóis totais

A1= absorvância medida

A3= absorvância do padrão

m1= massa da droga em g

m2= massa do padrão em g

4.5.2 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

Para a determinação da capacidade antioxidante através da redução do radical 2,2-difenil-1-hidrazila-picril (DPPH), utilizou-se a metodologia descrita por Amarowicz et al. (2004).

Os testes foram realizados com EB, FAE e FAQ, tendo sido primeiramente determinada a faixa de trabalho de concentração. Para tanto foi preparada uma solução mãe, onde 5 mg dos extratos foram pesados e dissolvidos em 10 ml metanol, sendo preparada uma diluição seriada de 500 a 0,25 µg/ml, com adição do radical DPPH. Os tubos com as concentrações que apresentaram colorações intermediárias (champanhe a amarelo claro) foram escolhidos. As faixas de trabalho determinadas para EB, FAE e FAQ foram, respectivamente: 0,5 à 6,5 µg/ml; 2 à 8 µg/ml e 0,5 à 6 µg/ml. Para os padrões vitamina C e Trolox, foram determinadas as faixas de 1 à 8 µg/ml. Foram determinadas 5 concentrações para a construção da curva de calibração.

1 ml da solução mãe foi transferida para balão volumétrico de 10 ml completado com metanol, originando a solução 2 (50 µg/ml). Então a solução 2 foi transferida para tubos de ensaio em quantidades calculadas de modo a atingir as concentrações determinadas na faixa de trabalho, e completados com metanol para 3 ml. À estas soluções foram acrescentados 300 µl de solução de DPPH (1 mmol/l). A mistura foi agitada em vortex por

15 s e deixada à temperatura ambiente durante 30 min. As absorvâncias das soluções resultantes foram medidas em espectrofotômetro a 517 nm. Como branco, foi utilizada uma solução metanólica de BHT (2 mg em 4 ml de metanol) adicionada de 500 µl de solução de DPPH e como controle negativo, uma solução contendo 3 ml de metanol e 300 µl de solução de DPPH. A vitamina C e o Trolox foram empregados como controles positivos, nos quais a preparação utilizada foi a mesma descrita para os extratos. O procedimento foi realizado em triplicata.

A atividade de sequestro de radicais (%ASR) foi calculada como porcentagem de descoramento do DPPH, usando a seguinte equação:

$$\%ASR = \frac{[(AbsCN - AbsA) \times 100]}{AbsCN}$$

Abs CN=Absorvância do controle negativo

Abs A= Absorvância da amostra

4.6 ANÁLISE QUÍMICA DA FRAÇÃO SEMIPURIFICADA DE *Trichilia catigua*

4.6.1 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no Estado Sólido

A análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^{13}C) no estado sólido da FAQ de catuaba foi realizada no equipamento RMN Varian Mercury plus BB ^1H 300,05 MHz e ^{13}C 75,5, com probe de sólidos CPMAS de 7mm, rotor de nitrito de silício de 7mm com tampa Kel-F, rotação de 100 kHz, pulso a 90° com 1,0 s de intervalo entre as sequências, total de 7168 repetições, frequência de 75 MHz.

O procedimento foi realizado no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá.

4.6.2 Métodos cromatográficos

Para obtenção das frações semipurificadas e caracterização da FAQ de *T. catigua*, diferentes métodos cromatográficos foram aplicados.

4.6.2.1 Eletroforese capilar

O método analítico foi desenvolvido com base na metodologia de Sereia (2013). Foi empregado um sistema capilar eletroforético Beckman P/ACE MDQ equipado com detector UV-Vis. O processamento de dados foi conduzido em software Beckman 32 Karat versão 8.0. Utilizou-se capilar da Beckman Coulter de sílica fundida de 75 µm de diâmetro interno com comprimento de 50/60, 2 cm (comprimento efetivo/comprimento total) e outro capilar de mesmas especificações, porém de 100µm de diâmetro interno.

Os parâmetros testados foram comprimento de onda (200, 214 e 254 nm); diâmetro do capilar (100 e 75µm); voltagem (15, 20, 25 e 30 kV); solução eletrolítica (fosfato e borato); concentração e pH do tampão borato, adição de ciclodextrinas e comparação de método de ECZ e MEKC.

Primeiramente os capilares foram condicionados com HCl 1,0 mol/l por 15 min, NaOH 1,0 mol/l por 15 min e água ultrapura por 5 min com posterior passagem de ar por 2 min para secagem dos capilares. A temperatura durante os procedimentos foi de 25 °C.

Antes do início das corridas, o capilar testado foi pré-condicionado por bombeamento de NaOH 1,0 mol/l por 5 min, água ultrapura por 5 min e solução tampão de enxágue por também 5 min. A injeção das amostras foi de 0,5 psi por 3 s, com tempo de corrida determinado em 10 min. Quando mais de uma corrida foi realizada de forma sequencial, fez-se necessário um procedimento de lavagem do capilar entre as amostras, no qual a solução tampão foi bombeada por 2 min. Ao final dos procedimentos, o capilar recebeu enxágue final composto de NaOH 1,0 mol/l por 5 min, água ultrapura por 5 min e bombeamento de ar por 2 min.

4.6.2.1.1 Preparo da solução amostra

A FAQ da catuaba foi preparada na concentração de 1 mg/ml, onde 5µg de amostra fora diluídos em 5 ml de solução metanol:água (2:8 v/v). A solução de amostra foi submetida à extração em fase sólida através de um cartucho previamente condicionado com 3 ml de metanol e 3 ml de água ultrapura. Antes da injeção, a amostra foi filtrada em membrana de filtro de 0,45 µm e transferida para vial de 1,8 ml.

4.6.2.1.2 Preparo da solução eletrolítica

Foi preparada solução tampão fosfato de sódio 70 mmol pH 7,0; no qual 0,553 g de fosfato de sódio monobásico decahidratado foi solubilizado em 100 ml de água ultrapura (solução A) e 0,5678 g de fosfato de sódio dibásico também solubilizado em 100 ml de água ultrapura (solução B). Em seguida a solução A foi titulada com a B até obtenção do pH desejado. Também foi testada solução tampão borato, cujas concentrações de soluções A e B encontram-se na tabela 1, onde a solução A foi titulada com a solução B até a obtenção de pH 8,40; 8,80 e 9,20. As soluções eletrolíticas foram filtradas em membrana. Nos ensaios com seletores quirais, foram empregadas β-ciclodextrinas (β-CD), metil-β-CD e 2-hidroxipropil-β-CD. Foi adicionada a quantidade adequada de CD na solução eletrolítica pronta, para a concentração de 10 mmol/l. As soluções estoque foram guardadas em geladeira por no máximo 48 h, sendo que as titulações foram realizadas no mesmo dia das corridas analíticas.

Tabela 1 - Preparo de soluções estoque para tampão borato.

Concentração Solução tampão em mmol	Tetraborato de sódio deca-hidratado (g) (solução A) para 100 ml de água ultrapura	Acido bórico (g) (Solução B) para 100 ml de água ultrapura
100	3,8137	0,6183
80	3,0569	0,4946
60	2,2882	0,37098

Para o desenvolvimento da eletroforese capilar micelar, o surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) foi adicionado à solução eletrolítica na concentração de 10 mmol/l.

4.6.2.1.3 Preparo da solução enxágue

A solução de enxágue empregada no método foi NaOH 1 mol/l. Para o preparo da mesma, 4,0 g de NaOH foram solubilizados em 100 ml de água ultrapura com auxílio de banho de ultrassom e posteriormente filtrada em membrana Millipore de 0,45 µm.

4.6.2.2 Cromatografia em coluna (CC)

A FAQ de *T. catigua* foi fracionada em coluna de vidro de 55x4,5cm, empacotada com Sephadex® LH-20 com altura de 18cm. O gel de Sephadex® G-25 também foi testado em coluna de vidro de 5x0,5cm.

A aplicação do sistema eluente foi composta por dioxano:água, de acordo com a metodologia de Hellenbrand e colaboradores(2015).

Para o desenvolvimento da coluna, quatro sistemas eluentes distintos foram testados, sendo o primeiro isocrático com uma solução de dioxano:água (7:3 v/v); o segundo composto de gradiente crescente de dioxano:água (tabela 2), outro gradiente de dioxano:água em concentração decrescente (tabela 3) e o quarto composto de metanol:água (tabela 4).

Tabela 2 – Eluição em gradiente crescente por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 para FAQ (2 g) de *Trichilia catigua*.

Fase móvel (v/v)	Volume aplicado (ml)
Dioxano:água (3:7)	20
Dioxano:água (4:6)	20
Dioxano:água (5:5)	20
Dioxano:água (6:4)	20
Dioxano:água (7:3)	20

Tabela 3—Eluição em gradiente decrescente por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 contendo FAQ (2 g) de *Trichilia catigua*.

Fase móvel (v/v)	Volume aplicado (ml)
Dioxano:água (7:3)	20
Dioxano:água (6:4)	20
Dioxano:água (4:6)	20
Dioxano:água (3:7)	20
Dioxano:água (2:8)	20

Tabela 4—Eluição da subfração F2.3 (1,950 g) de *Trichilia catigua* por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20.

Fase móvel (v/v)	Volume aplicado (ml)
Metanol:água (7:3)	150
Metanol:água (6:4)	150
Metanol:água (4:6)	150
Metanol:água (3:7)	150
Água	200
Dioxano:água (7:3)	200

Cerca de 2g da FAQ foram aplicados por vez na coluna de 55x4,5 cm com vazão de 1,8 ml/min, o procedimento foi repetido 6 vezes para maior obtenção de amostras.

4.6.2.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD foi realizada em cromatofolhas de alumínio em gel de sílica, para monitoramento das alíquotas obtidas a partir das frações obtidas das cromatografias em coluna realizadas em Sephadex®. Como fase móvel, dois sistemas foram utilizados, sendo (1) dioxano:água (7:3 v/v) e (2) acetato de etila:ácido fórmico:água (9:0,5:0,5 v/v).

As amostras aplicadas eram de caráter altamente polar, portanto ficavam fortemente aderidas à placa cromatográfica, o que justificou a utilização de duas fases móveis. Primeiramente a fase móvel (1) foi utilizada até que o sistema eluente atingisse aproximadamente metade da placa, após a mesma foi retirada, seca e novamente colocada em cuba saturada com o sistema eluente (2) até completo desenvolvimento do cromatograma. Após a secagem, as placas foram observadas sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

4.7 TRIAGEM MICROBIOLÓGICA

Foi realizada a avaliação da atividade antimicrobiana do EB, FAE e FAQ de catuaba contra as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* e *Enterococcus faecium*. Os fungos avaliados foram as leveduras *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* e também os fungos dermatófitos *Tricophyton mentagrophytes*, *Tricophyton rubrum* e *Microsporum gypseum*.

4.7.1 Condições de crescimento

As bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6623, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecium* ATCC 5669 foram cultivadas em Caldo Mueller Hinton (CMH) (Difco) a 37 °C e mantidas em Ágar Mueller Hinton (AMH) (Difco) a 4 °C. Neste estudo também foi utilizado um isolado clínico de *E. faecium* resistente a vancomicina (EFRV) de número 170, obtido no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, armazenado em CMH com ajuste de cátions com 30% de glicerol a -20°C. O perfil de resistência do isolado encontra-se no quadro 2.

Quadro2- Perfil de resistência do isolado 170: ampicilina (AMP), cirpofloxacino (CIP), eritromicina (ERI), estreptomicina (EST), teicoplanina (TEI), tetracilina (TET), vancomicina (VAN). Fonte: Ruzón et al., 2010).

Isolado	Fonte	Perfil de resistência
170 EFRV	Infecção	AMP, CIP, ERI, ETR, TEI, TET, VAN

A *Helicobacter pylori* ATCC 43504, por ser uma bactéria fastidiosa, foi previamente cultivada em caldo BHI suplementado com 10% de soro bovino fetal (BSA) e incubada por 24 h a 37°C e atmosfera de 10% de CO₂.

As leveduras *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. tropicalis* ATCC 28707, foram cultivadas em caldo Sabraud Dextrose (CSD) (Difco) a 37 °C e mantidas em Ágar Sabraud Dextrose (ASD) (Difco) a 4 °C. Os fungos dermatófitos *T. rubrum* ATCC 28189, *T. mentagrophytes* ATCC 11480 e *M. gypseum* ATCC 14683 foram mantidos em ASD inclinado a 28°C por 15 a 21 dias e subcultivados mensalmente. Após o crescimento dos fungos dermatófitos, 10 ml de solução salina estéril foram transferidos para o tubo de cultura seguido de forte agitação e filtração estéril. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer e o inóculo ajustado a 10⁶ conídeos/ml.

Antes de cada experimento, os micro-organismos foram cultivados em meio líquido a 37 °C, durante 24h. Para os testes de sensibilidade a antimicrobianos, a densidade celular dos micro-organismos foi padronizada em tubos contendo salina 0,9% estéril, nos quais volumes suficientes de cada cultura foram adicionados até que a turvação ficasse idêntica àquela comparada à metade do tubo 1 da escala de McFarland (suspensão de BaSO₄ que corresponde a $1-5 \times 10^6$ UFC/ml para leveduras e 1×10^8 UFC/ml para bactérias).

4.7.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos, para as leveduras, foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo, utilizando o meio de cultura Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Sigma-Aldrich), pH 7,0, tamponado com 0,165 M de tampão ácido-3-[N-morfolino] propanossulfônico (MOPS) (Sigma-Aldrich) de acordo com procedimento de referência (CLSI, 2002). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, nos quais foram adicionados 100 µl de meio RPMI em cada poço, seguida da adição de 100 µl de meio RPMI acrescido dos extratos na concentração de 2000 µg/ml no primeiro poço, prosseguindo com diluição seriada (ordem 2), homogeneizando e transferindo 100 µl para o poço seguinte e, assim, sucessivamente até o último poço.

As suspensões das leveduras padronizadas em solução salina 0,9% foram diluídas 1:100 em RPMI e 5 µl destes foram adicionados a cada poço, resultando em inóculo na ordem de $0,5$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/ml. As placas de 96 poços foram incubadas a 37 °C durante 48h.

Para *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, a CIM dos extratos de catuaba foi determinada da mesma forma, porém utilizando o meio de cultura CMH. As suspensões bacterianas padronizadas foram diluídas 1:10 e 5 µl destes foram adicionados a cada poço, resultando em inóculo de 1×10^4 UFC/ml. O tempo de incubação foi de 24h a 37 °C (CLSI, 2006).

Para CIM dos fungos dermatófitos foram adicionados 100 µl de RPMI em cada poço de uma microplaca de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 100 µl do extrato avaliado no primeiro poço, na concentração de 1000 µg/ml e feita a diluição seriada (1:2), transferindo 100 µl do primeiro poço para o poço subsequente. A operação foi repetida até o penúltimo poço, deixando o último poço como controle negativo. Após a diluição, foram adicionados aproximadamente 2000 – 3000 conídeos. A placa foi incubada a 28°C por 72 h em câmara úmida.

Outro protocolo foi empregado para *H. pylori*, onde os extratos de catuaba foram solubilizados em 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) e BHI suplementado com 10% de BSA. A concentração da suspensão de EB, FAE e FAQ foi ajustada para 2000µg/ml. Em uma placa de 96 poços (uma para cada extrato a ser testado), 100 µl de caldo BHI suplementado com

10% de BSA foi adicionado em cada poço, sendo em seguida adicionados 100 µl da suspensão de 2000 µg/ml do extrato em questão aos poços da primeira fileira, obtendo-se desta forma uma concentração inicial de 1000 µg/ml. Em seguida, realizaram-se diluições seriadas, homogeneizando e transferindo-se 100 µl da primeira fileira até a décima fileira, obtendo-se desta forma um gradiente de concentração decrescente de ordem 2. As colunas 11 e 12 da placa foram utilizadas como controle de crescimento bacteriano normal (contendo somente o meio de cultura e a suspensão bacteriana). A todos os poços foram adicionados 5 µl da suspensão de micro-organismos padronizada, e em seguida a placa foi incubada a 37 °C em microaerofilia (10% de CO₂) durante 72 h. Em paralelo a microdiluição em caldo, realizou-se a leitura turbidimétrica das mesmas placas utilizadas em leitor de microplacas em comprimento de onda de 560 nm.

A determinação do CIM de *E. faecium* foi realizada de acordo com o procedimento do CLSI (2011) com inóculo de 5x10⁴ UFC/ml. Os extratos de catuaba foram solubilizados com DMSO e esterilizados através de filtração com membrana de 0,22 µm (Millipore), as concentrações testadas foram de 125 a 0,24 µg/ml através de diluição seriada de ordem 2. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços contendo 100 µl de CMH com ajuste de cátions, em seguida o inóculo foi adicionado em cada poço. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24h.

Os antimicrobianos de referência empregados foram penicilina (PE) para *S. aureus*, vancomicina (VAN) para *B. subtilis*, tetraciclina (TET) para *E. coli* e claritromicina (CLA) para *H. pylori*.

Todos os procedimentos descritos foram realizados para EB, FAE e FAQ de catuaba, em triplicata e repetidos três vezes. A CIM foi determinada como a menor concentração dos extratos capaz de inibir o crescimento microbiano.

4.7.3 Determinação da concentração bactericida mínima de *H. pylori*

A partir das placas de 96 poços utilizadas na determinação do CIM de *H. pylori*, descrito na sessão 4.7.2, 10µl de cada poço das diluições seriadas dos extratos foram adicionadas, na forma de “spot”, em placas de petri contendo ágar sangue 5%. As placas foram então incubadas por 24h em estufa a 37°C com atmosfera de 10% de CO₂.

O experimento foi realizado em triplicata e a CBM foi determinada como a menor concentração capaz de causar morte celular das bactérias.

4.7.4 Avaliação dos extratos sobre ergosterol de leveduras

Em placas de 96 poços foram adicionados 100 µl de meio RPMI contendo uma solução de ergosterol nas concentrações de 400 µg/ml na linha A, 200 µg/ml na linha B, 100 µg/ml na linha C e 50 µg/ml na linha D até a coluna 11. Na linha E e F foram acrescentados

100 µl de meio RPMI até a coluna 11. Posteriormente, acrescentaram-se 100 µl da FAE na concentração de 1000 µg/ml nas linhas A1, B1, C1, D1 e E1. Na linha F1 foram adicionados 100 µl de uma solução de anfotericina B na concentração de 125 µg/ml, utilizada como controle. Realizou-se a diluição seriada de todas as linhas até a coluna 11, desprezando os 100 µl restantes. Na coluna 12 foram acrescentados 100 µl do meio RPMI utilizado como controle positivo. A partir de suspensão padronizada das leveduras de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, o inóculo foi preparado em RPMI e 5 µl foram adicionados a cada poço, resultando em inóculo na ordem de 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/ml. Após incubação a 37 °C durante 48h o resultado foi verificado através de observação da inibição de crescimento visível.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH

A técnica descrita para determinação de polifenóis totais emprega a droga vegetal moída. Neste trabalho a técnica foi adaptada para a utilização dos extratos de *T. catigua* (EB, FAE e FAQ), no qual foi realizado um cálculo de porcentagem de acordo com o rendimento dos respectivos extratos. Os valores encontrados de rendimentos e polifenóis totais podem ser observados na tabela 5.

Os teores de polifenóis encontrados foram semelhantes aos descritos para EB e FAE por Longhini (2013), que foram de 42,34% e 68,86% respectivamente.

Tabela 5 – Rendimento, polifenóis totais e capacidade antioxidante das frações de *Trichilia catigua*.

Amostras	Rendimento (%)	Polifenóis totais	IC ₅₀
		Média % ±dp (CV%)	Média µg/ml ± dp (CV%)
EB	19,5	39,46 ±0,17 (0,44)	7,07 ± 0,26 (3,70)
FAE	27,96	62,98 ± 0,58 (0,93)	5,89 ± 0,23 (3,90)
FAQ	72,04	35,32 ± 0,22 (0,64)	7,77 ± 0,20 (2,69)
Vitamina C	-	-	7,21 ± 0,28 (3,90)
Trolox	-	-	3,54 ± 0,08 (1,25)

EB= extrato bruto; FAE=fração acetato de etila; FAQ= fração aquosa; dp=desvio padrão; CV%= coeficiente de variação em porcentagem.

As amostras analisadas apresentaram capacidade antioxidante comparável à vitamina C e Trolox. Resende (2007) e Longhini (2013) demonstraram resultados semelhantes para EB e FAE de *T. catigua* de mesma procedência obtidos neste trabalho, com lotes diferentes.

A capacidade antioxidante de *T. catigua* tem relação direta com o alto teor de polifenóis encontrados. Tal fato se deve às propriedades sequestradoras de radicais livres das substâncias fenólicas, bem como sua atividade quelante de metais, agindo tanto nas etapas iniciais, como no processo oxidativo em si (SOARES, 2002). A extensão de conjugações e grau de hidroxilação parecem ser os responsáveis pela capacidade redutora dos polifenóis (PULIDO et al., 2000).

Resende (2007) determinou a atividade antioxidante das substâncias isoladas de *T. catigua* epicatequina, cinconhaínas Ia, IIa, Ib, IIb e as procianidinas B2 e C1. Todas as substâncias tiveram atividade muito superior aos padrões vitamina c e trolox. A autora relacionou tal atividade ao número de hidroxilas das substâncias.

Segundo Kamdem e colaboradores (2012) as cascas de *T. catigua* apresentam capacidade antioxidante *in vitro* em diversos modelos, apresentando potencial para desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças decorrentes do estresse oxidativo e também para o uso nas mais diversas áreas farmacêuticas e cosméticas.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO AQUOSA

5.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no Estado Sólido

O espectro de RMN de ^{13}C no estado sólido da FAQ de *T. catigua* pode ser observado na figura 9.

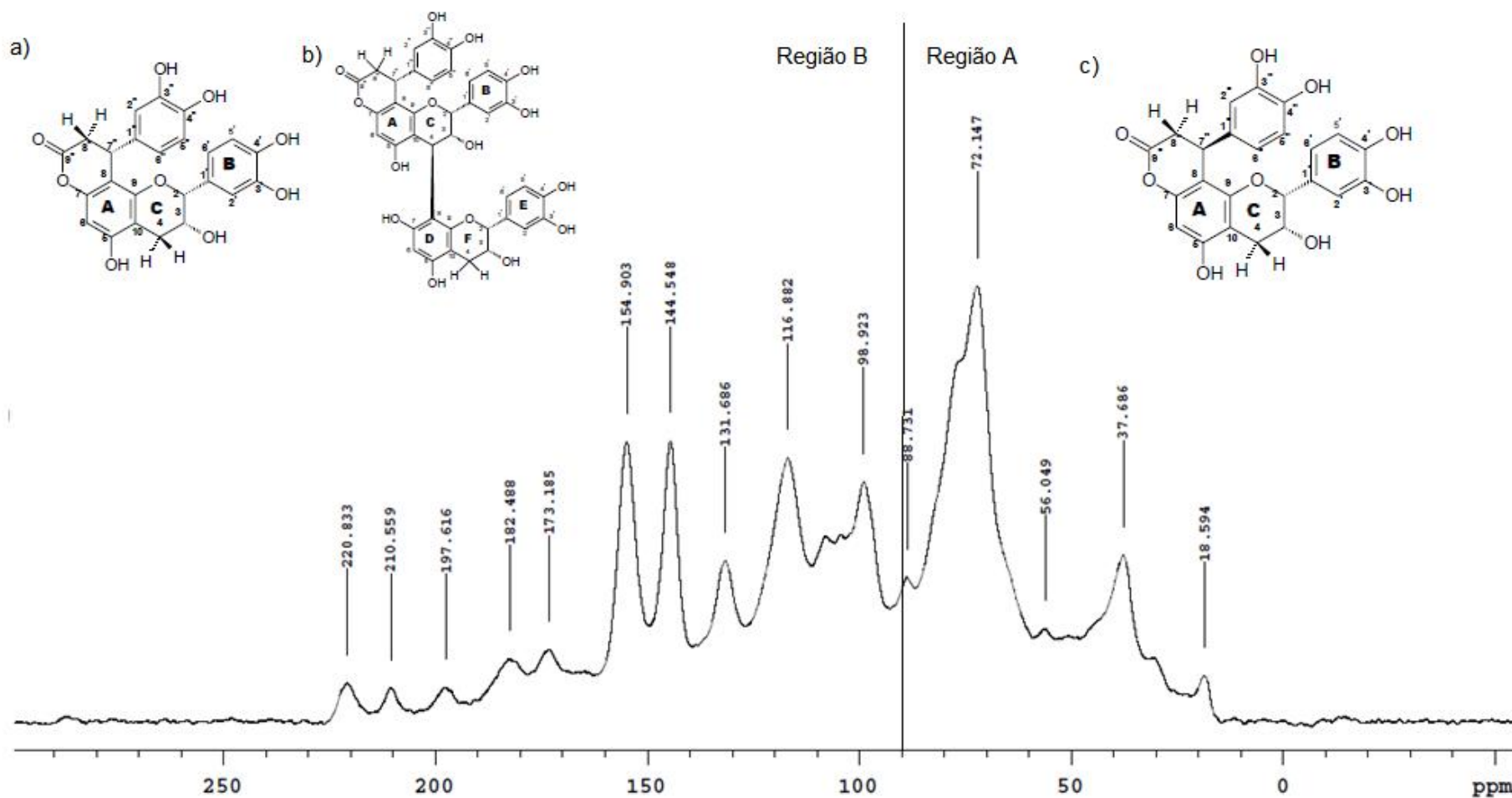


Figura 9 –Espectro de ^{13}C RMN no estado sólido da FAQ de *T. catigua*. **a)** Cinchonaína Ib; **b)** Chinchonaína IIb; **c)** Cinchonaína Ia.

A avaliação dos sinais presentes no espectro de RMN ^{13}C (δ em ppm) da FAQ de catuaba foi realizada de acordo com os trabalhos de Ishida (2006) e Resende (2007). Primeiramente, o espectro foi dividido em grandes duas regiões, os deslocamentos entre δ 30 e δ 90 ppm correspondem ao anel da região A, e entre δ 90 e δ 160 ppm o anel da região B (NEWMAN & PORTER, 1992).

De acordo com Newman e Porter (1992), o sinal correspondente ao deslocamento químico de δ 56 ppm é característico de grupamentos metoxila de ligninas. Picos presentes em δ 154 e δ 144 ppm são característicos de taninos condensados (Lorenz et al., 2004), o que confirma que a FAQ de catuaba é composta majoritariamente por taninos oligoméricos de alto peso molecular.

Resende (2007) isolou e identificou 9 substâncias da FAE de catuaba através de cromatografia em contra corrente e RMN, das quais cinchonaínas do tipo I e II, além do monômero derivado de epigallocatequina, a apocinina E, essa isolada pela primeira vez em produtos naturais. O espectro de RMN ^{13}C obtido da FAQ de catuaba foi comparado com os dados de carbono da autora, o que sugeriu a presença de carbonos característicos de cinchonaínas, principalmente na banda a δ 37 ppm.

Observa-se uma banda larga centrada em aproximadamente δ 37 ppm, que pode corresponder ao C-4 de unidades de procianidina e prodelfinidina (KOUPI-ABYAZANI et al., 1993a) ou de prorobinetinidina (FOO et al., 2000) com deslocamento químico em δ 36 ppm. Em extratos de *T. catigua* foram isoladas as cinchonaínas (tipos I e II) e que apresentam sinais correspondentes aos carbonos C-7" e C-8" entre δ 35 e δ 37 ppm (RESENDE, 2007).

Sinais em δ 72-73 ppm correspondem ao C-3 das unidades de procianidina e prodelfinidina na extensão do polímero que por esta análise não é possível estabelecer o tamanho (KOUPI-ABYAZANI & BOHM, 1993b; FOO et al., 2000). Ainda, os sinais da banda entre δ 72 e δ 77 ppm podem representar unidades de proantocianidinas com configuração relativo tipo 2,3-*cis* e 2,3-*trans*.

O sinal em torno de δ 99 ppm pode corresponder ao carbono 4a de 2,3-*cis* de proantocinidinas, de acordo com a figura 9. Já o pico em aproximadamente δ 117 ppm pode ser correspondente a dihidroxilação no anel B da porção da catequina/epicatequina presentes no extrato de *T. catigua*.

De acordo com os sinais estabelecidos para os monômeros e dímeros de cinchonaínas (RESENDE, 2007), aqueles correspondentes ao C-1" (δ 142 ppm), que podem se sobrepor aos C-3' e C-4' do anel B de procianidina e mesmo prodelfinidina, em torno de δ 144 ppm, ou ainda de C-3" e C-4", pode auxiliar na confirmação do anel fenilpropanoide presente nas cinchonaínas.

Apesar do sinal em cerca de δ 155 ppm poder representar os carbonos não hidrogenados, como os carbonos 9 e 10 do anel B (NEWMAN & PORTER, 1992), o mesmo pode-se dizer dos sinais correspondentes a δ 132, 145 e 155 ppm, independente de outras análises.

No entanto, pode ser observada uma banda relativamente bem estabelecida em δ 173 ppm que pode representar o C-9" do anel lactônico da porção fenilpropanoide, ou ainda C=O.

Para análises necessárias, Resende (2007) determinou os carbonos característicos de cinchonaínas do tipo I e II. Cinchonaína Ia (δ em ppm): C-7" (35,3), C-8" (38,6) e C-9" (170,8). Cinchonaína Ib (δ em ppm): C-7" (34,9), C-8" (36,5) e C-9" (167,1). Cinchonaína IIa (δ em ppm): C-7"/C-8" ($\cong$ 36) e C-9" ($\cong$ 169). Cinchonaína IIb (δ em ppm): C-7" (34,6), C-8" (36,9) e C-9" (167,1).

A partir da interpretação dos sinais presentes na figura 9, sugere-se a presença de cinchonaínas do tipo I e II na amostra de FAQ de catuaba analisada por RMN de ^{13}C . Dessa maneira pode ser sugerir que as substâncias químicas presentes na fração aquosa (FAQ) de catuaba sejam compostas por proantocianidinas e contando com a presença de porção fenilpropanoide, principalmente pelos sinais correspondentes ao C-7", C-8" e C-9".

5.2.2 Desenvolvimento de metodologia por eletroforese capilar (EC)

5.2.2.1 Comprimento de onda (λ)

Foram testados os comprimentos de onda de 200, 214 e 254 nm. Os eletroferogramas obtidos encontram-se na figura 10.

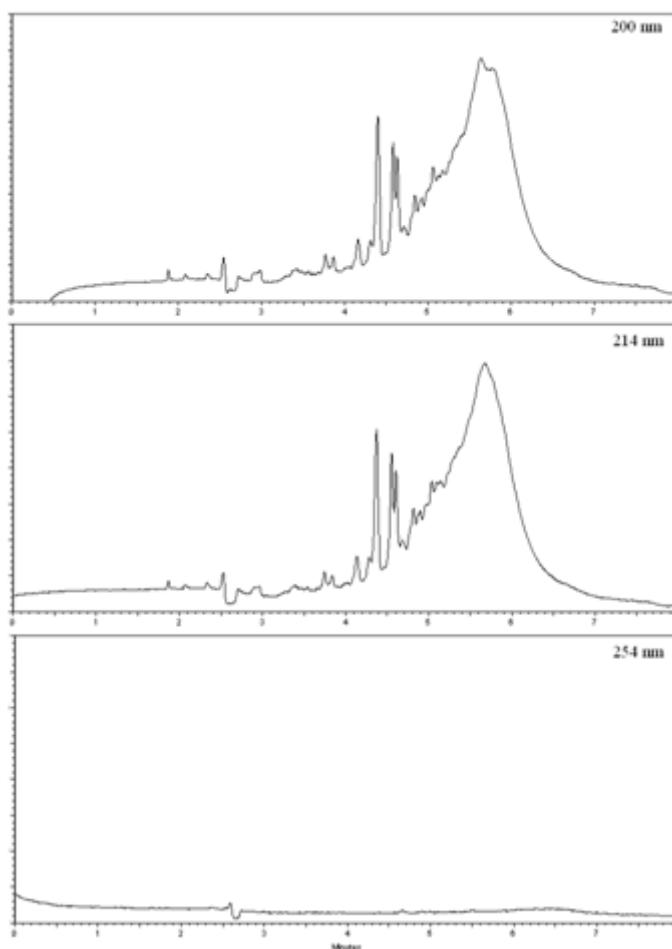


Figura 10 - Eletroferogramas da FAQ de *Trichilia catigua* com detecção a 200, 214 e 254 nm. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; pH 8,8; capilar 75 μ m; voltagem: 30 kV a 25 $^{\circ}$ C; injeção: 3 s (0,5 psi); FAQ:1 mg/ml.

Várias metodologias para extratos vegetais por EC foram desenvolvidas, onde foram empregados comprimentos de onda entre 210 à 280 nm (CHEUNG & ZHANG, 2008; LI et al., 2010; ITO, 2011; CHEN et al., 2011). O equipamento de EC utilizado é de banda fixa, ou seja, apenas comprimentos de onda determinados podem ser utilizados, por esse motivo apenas três foram testados.

Os testes realizados no presente trabalho mostraram leitura nos comprimentos de onda de 200 e 214 nm, assimoptou-se pela fixação do λ à 214 nm, pela melhor resolução de linha de base, com menor ruído. Tal comprimento de onda também foi o de escolha na metodologia desenvolvida para FAE de *T. catigua* por Sereia (2013).

5.2.2.2 Diâmetro de capilar

Os perfis eletroforéticos obtidos com os capilares de 75 μ m e 100 μ m podem ser observados na figura abaixo.

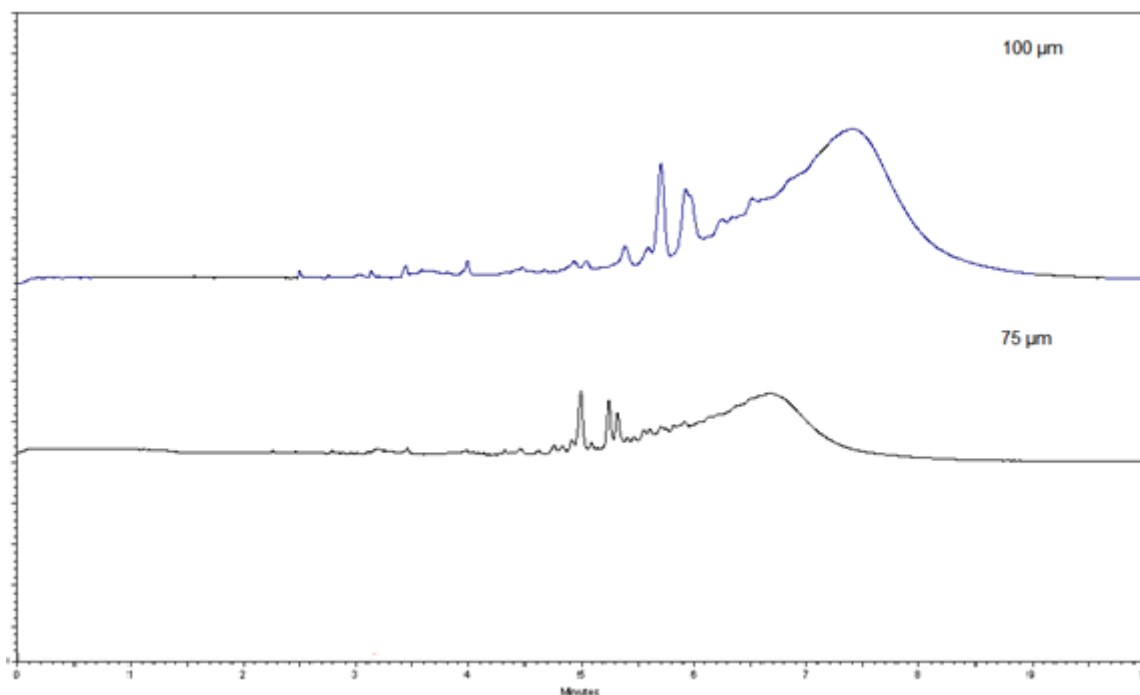


Figura 11 - Eletroferogramas da FAQ de *Trichilia catigua* com capilares de 75 e 100 μm . Condições eletroforéticas: detecção a 214 nm; tampão borato 80 mmol; pH 8,8; voltagem: 20 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); FAQ:1 mg/ml.

O capilar utilizado deve ser resistente, transparente e ter o menor diâmetro interno (I.D.) possível. Quanto menor o diâmetro, maior será a razão área/volume, isso faz com que o efeito Joule seja evitado e possibilita a aplicação de altas voltagens, o que resulta em separações mais rápidas e eficientes. O tamanho das substâncias presentes na amostra também deve ser considerado para a escolha do I.D. do capilar, a fim de evitar o entupimento do mesmo (WEINBERGER, 1993; TAGLIARO et al., 1998; HU & MARTIN, 1999; LUNTE et al., 2002). A FAQ de *T. catigua* apresenta majoritariamente proantocianidinas de alto peso molecular, portanto, optou-se pela utilização de capilares de maior calibre.

De acordo com a figura 11, o eletroferograma obtido com o capilar de 75 μm de I.D. apresentou melhor perfil de separação e resolução, dividindo os picos presentes entre 5 e 5,5 min, portanto foi escolhido para os demais testes.

5.2.2.3 Influência da solução tampão

Com o objetivo de verificar a influência da solução eletrolítica (tampão), foram testadas as soluções tampão borato 80 mmol pH 8,8 e tampão fosfato 70 mmol pH 7,0. Os eletroferogramas correspondentes podem ser observados na figura 12.

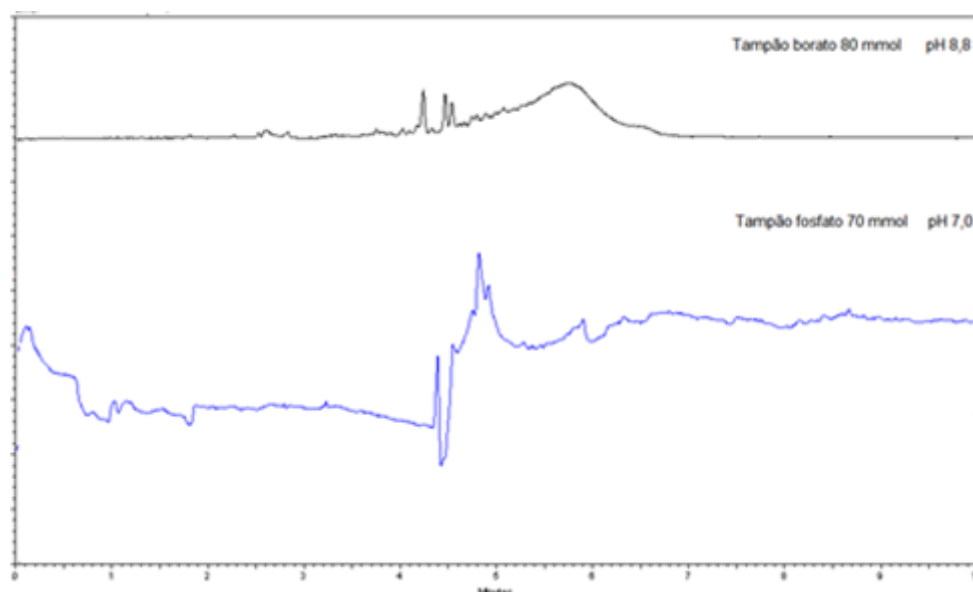


Figura 12 - Eletroferogramas da FAQ de *Trichilia catigua*. Condições eletroforéticas: detecção a 214 nm; capilar de 75 μ m; tampão borato 80 mmol; pH 8,8 e tampão fosfato 70 mmol; pH 7,0; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); FAQ:1 mg/ml.

A seleção da solução tampão implica diretamente na otimização da separação devido à alta sensibilidade do fluxo eletro-osmótico (FEO) a variações de pH. O tampão adequado deve ser capaz de apresentar uma constância de pH, baixa absorvância no comprimento de onda empregado na análise e também baixa mobilidade, a fim de minimizar o efeito Joule. Os tampões que apresentam mobilidades iônicas semelhantes às da amostra previnem o alargamento de picos (TAVARES, 1997).

Os tampões comumente utilizados são borato, fosfato, fosfato-borato e citrato, pois tem melhor capacidade tamponante e reduzem a adsorção de substâncias à parede do capilar (TAGLIARO et al., 1998).

Sereia (2013) obteve bons resultados com a utilização de tampão borato em EC de FAE de *T. catigua*. Conforme observado na figura 12, o tampão borato também apresentou claramente um perfil de melhor resolução para FAQ de *T. catigua*, apresentando linha de base linear com baixo ruído e uma boa separação dos analitos, sendo o tampão de escolha no presente desenvolvimento.

5.2.2.4 Concentração do tampão

Os efeitos da concentração do tampão borato (60, 80 e 100 mmol) na amostra de FAQ de *T. catigua* podem ser observados na figura 13.

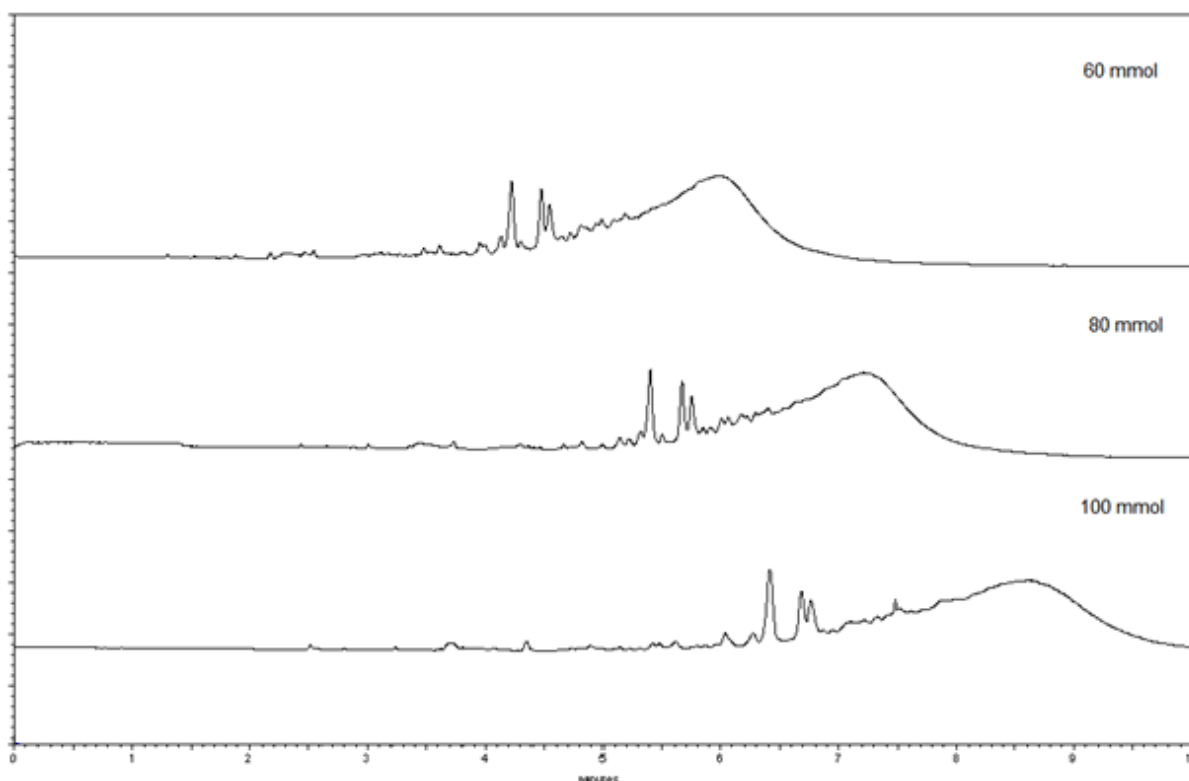


Figura 13 - Eletroferogramas da FAQ de *Trichilia catigua* em diferentes concentrações da solução eletrolítica. Condições eletroforéticas: tampão borato 60, 80 e 100 mmol; pH 8,8; capilar 75 μ m; voltagem: 30 kV a 25 $^{\circ}$ C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAQ: 1 mg/ml.

A concentração, ou força iônica do tampão, tem relação direta com a mobilidade dos analitos. O aumento da concentração leva geralmente a um aumento de viscosidade do tampão, o que diminui o potencial zeta e o FEO, consequentemente gerando picos mais definidos, porém aumentando o tempo de análise (WEINBERGER, 1993; BAKER, 1995; CHEUNG; ZHANG, 2008). Concentrações muito altas de tampão podem contribuir para o aparecimento de efeito Joule, portanto, as concentrações ideais devem estar entre 10 a 100 mmol (BAKER, 1995; CHU et al., 2008).

O aumento da força iônica da solução eletrolítica no presente desenvolvimento gerou maior tempo de migração dos analitos e diferenças significativas na resolução. O perfil obtido com a concentração de 80 mmol (figura 13) apresentou um melhor perfil, onde pode ser observado uma divisão mais efetiva nos picos presentes entre 5,5 e 6 min e maior desdobramento do aglomerado proantocianidínico, verificado entre 6 e 8 min. Portanto, foi fixada a concentração do tampão borato à 80 mmol.

5.2.2.5 pH do tampão

Na avaliação da influência do pH do tampão borato 80 mmol, o mesmo foi testado em valores de pH de 8,4; 8,8 e 9,2.

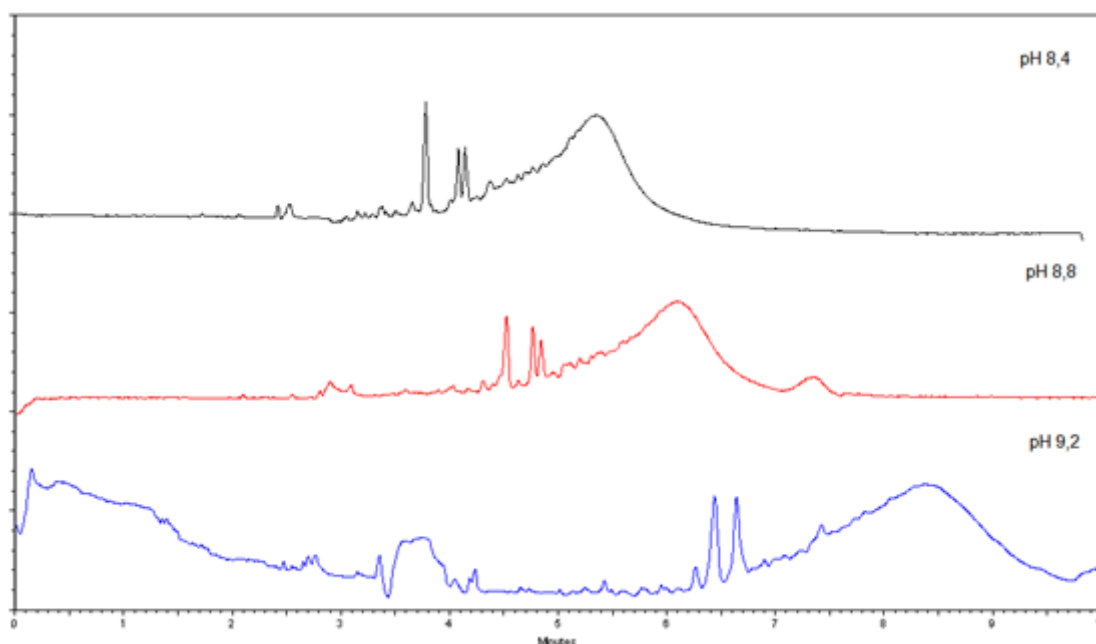


Figura 14 - Eletroferogramas da FAQ de *Trichilia catigua* em diferentes pHs de solução eletrolítica. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; capilar 75 μ m; voltagem: 30 kV a 25 $^{\circ}$ C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAQ: 1 mg/ml.

O pH da solução tampão afeta significativamente o FEO. Quanto maior o pH, maior é a ionização dos grupos silanóis do capilar, o que aumenta o FEO. O pH empregado para o tampão borato é geralmente na faixa de 8,0 a 9,4 (GUTERRES, 2005; CHEUNG; ZHANG, 2008; CHU et al., 2008; ITO, 2011).

A figura 14 mostrou que o aumento do pH de 8,4 para 8,8 resultou num maior tempo de migração dos compostos, com diminuição do FEO. O pH de 9,2 não apresentou um bom perfil eletroforético, sendo portanto descartado.

A diminuição do FEO com o aumento do pH também foi observada por Sereia (2013), Guterres (2005), Cheung e Zhang (2008) e Chu e colaboradores (2008). Segundo Guterres (2005) frações vegetais polares e de alto peso molecular podem diminuir o FEO devido à um aumento da viscosidade do meio, e também permitir a adsorção de partículas à parede do capilar. Já Sereia (2013) propôs que o caráter básico do tampão favoreceu a dissociação dos polifenóis da FAE de *T. catigua*, aumentando a interação de analitos carregados negativamente à parede do capilar, favorecendo a separação.

Neste trabalho, ambos os pHs 8,4 e 8,8 apresentaram bons resultados. Então optou-se pelo pH 8,8, pois o caráter intermediário do perfil eletroforético do mesmo causou menos interferências nos demais parâmetros testados.

5.2.2.6 Adição de seletos quirais

Os perfis obtidos com a adição de seletos quirais podem ser observados na figura 15.

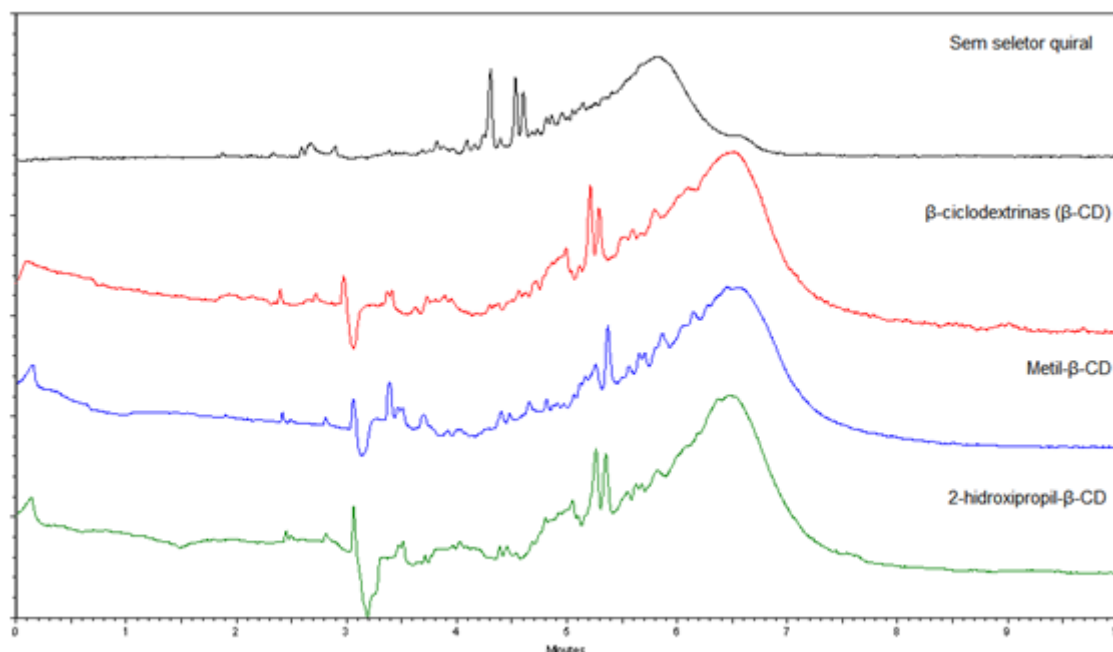


Figura 15 - Eletroferogramas da FAQ de *Trichilia catigua* com adição de diferentes seletos quirais. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; pH 8,8; capilar 75 μ m; voltagem: 30 kV a 25 $^{\circ}$ C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAQ: 1 mg/ml.

Vários tipos de seletos quirais quimicamente modificados podem ser encontrados, com alta solubilidade e capacidade de aumentar a resolução de perfis eletroforéticos. As ciclodextrinas (CDs) são extremamente úteis para separação de enantiômeros, pois possuem uma cavidade hidrofóbica opticamente ativa e uma porção externa hidrofílica, gerando a formação de complexos com vários tipos de substâncias. Ainda não existem informações na literatura suficientes para prever o comportamento das CDs em diferentes amostras, portanto, a seleção da CD ideal é um processo complexo, baseado em pesquisas de tentativa e erro (WEINBERGER, 1993; BAKER, 1995; ALTRIA, 1999; WIND et al., 2000; AHUJA & JMIDAR, 2008; EECKHAUT & MICHOTTE, 2010).

Conforme observado na figura 15, a adição de ciclodextrinas na solução eletrolítica não foi capaz de melhorar o perfil eletroforético, aumentando o ruído, gerando inflexões e inconstância na linha de base. Tal fato pode estar relacionado às características da amostra, onde os complexos de inclusão formados pelas CDs com os analitos podem ter aumentado ainda mais o caráter polar, e também o tamanho das moléculas, aumentando a afinidade pelos grupos silanóis presentes na parede do capilar e dificultando a passagem pelo

mesmo. Portanto, a utilização de seletos quirais foi descartada no presente desenvolvimento.

5.2.2.7 Método eletroforético de zona e micelar (MEKC)

Também foi realizado procedimento de eletroforese capilar micelar, que consistiu na adição de um surfactante eletricamente carregado ao tampão de corrida.

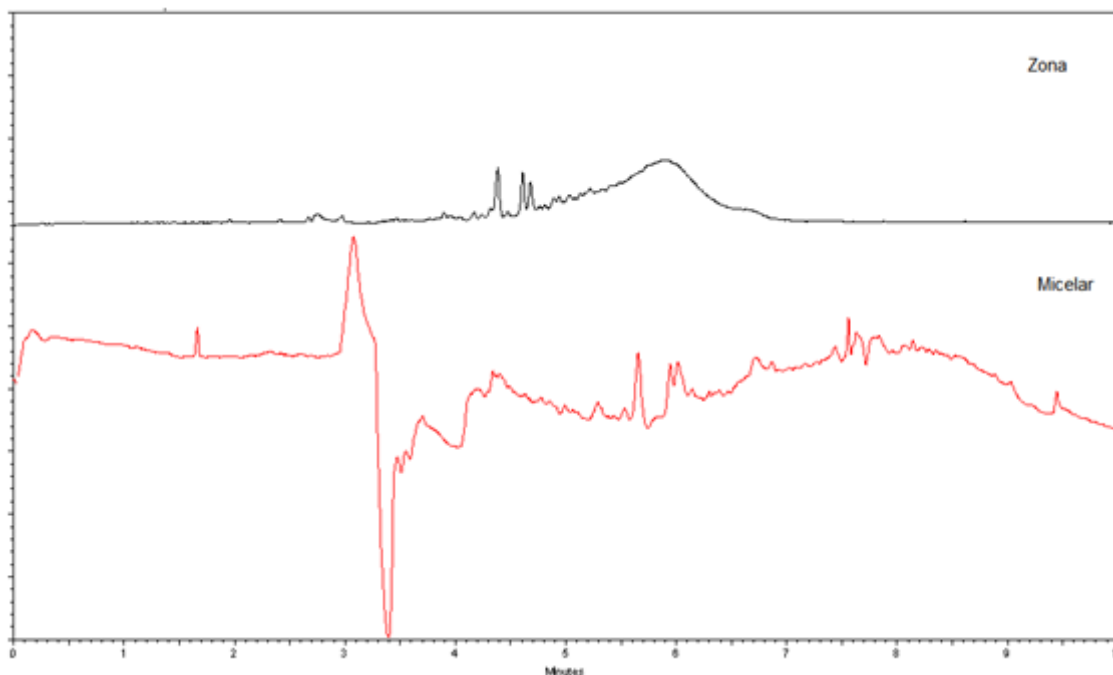


Figura 16 - Eletroferogramas da FAQ de *Trichilia catigua* no método de zona e micelar. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; pH 8,8; capilar 75 μ m; voltagem: 30 kV a 25 $^{\circ}$ C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAQ: 1 mg/ml.

Como a ECZ é limitada a substâncias ionizáveis, o objetivo da aplicação de MEKC foi verificar se o grupo de substâncias apresentadas era de caráter neutro, pois os surfactantes tem a capacidade de formar micelas eletricamente carregadas, possibilitando a separação.

Como observado na figura 16, não houve melhora do perfil com a adição de SDS ao tampão de corrida. Portanto, a técnica de ECZ foi fixada para a FAQ de *T. catigua*.

5.2.2.8 Voltagem

A voltagem influencia a velocidade de migração dos analitos e o FEO, pois determina a força do campo aplicado, e quanto maior, mais rapidamente as substâncias irão migrar pelo capilar. Para matrizes complexas e extratos vegetais, normalmente empregam-se voltagens entre 15 e 25 kV (GUTERRES, 2005; CHEUNG; ZHANG, 2008; CHU et al., 2008; PERES et al., 2009; LI et al., 2010; CHEN et al., 2011). Sereia (2013) aplicou 18 kV no

desenvolvimento eletroforético da FAE de *T. catigua*, porém, como a FAQ da mesma planta apresenta características diferentes, neste trabalho, foram testadas voltagens de 15, 20, 25 e 30 kV, que podem ser observadas na figura 17.

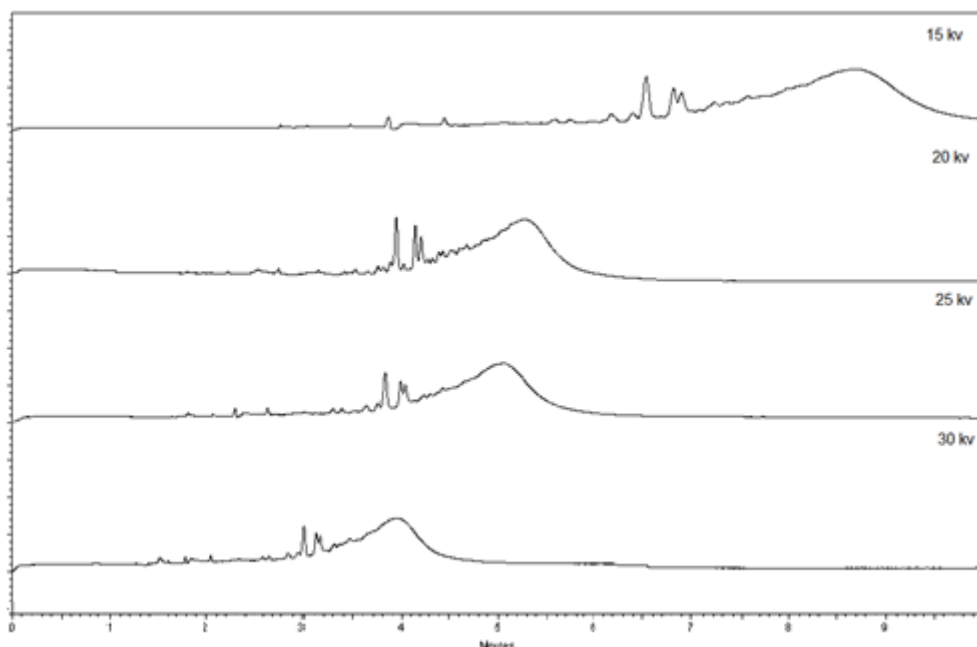


Figura 17 - Eletroferogramas da FAQ de *Trichilia catigua*. Condições eletroforéticas: detecção a 214 nm; capilares de 75 μ m; tampão borato 80 mmol; pH 8,8; voltagem: 15, 20, 25 e 30 kV a 25 $^{\circ}$ C; injeção: 3 s (0,5 psi); FAQ:1 mg/ml.

Conforme observado na figura 17, o emprego de maiores voltagens aumentou a velocidade de migração das substâncias, tendo forte impacto sobre o tempo de corrida.

Também foram verificadas diferenças na resolução, sendo que a voltagem de 20 kV apresentou o melhor perfil para FAQ de *T. catigua*, que pode ser observado pela melhor separação dos picos entre 4 e 4,5 minutos, sendo então a voltagem de escolha no presente desenvolvimento, possibilitando corridas rápidas e efetivas.

5.2.2.9 Condições eletroforéticas para FAQ de *Trichilia catigua*

Através dos testes realizados, as melhores condições eletroforéticas para a fração aquosa de *T. catigua* foram: eletroforese capilar de zona (ECZ); detecção à 214nm; capilar de 75 μ m; tampão borato 80 mmol pH 8,8; voltagem de 20 kV. O perfil otimizado pode ser observado na figura 18.

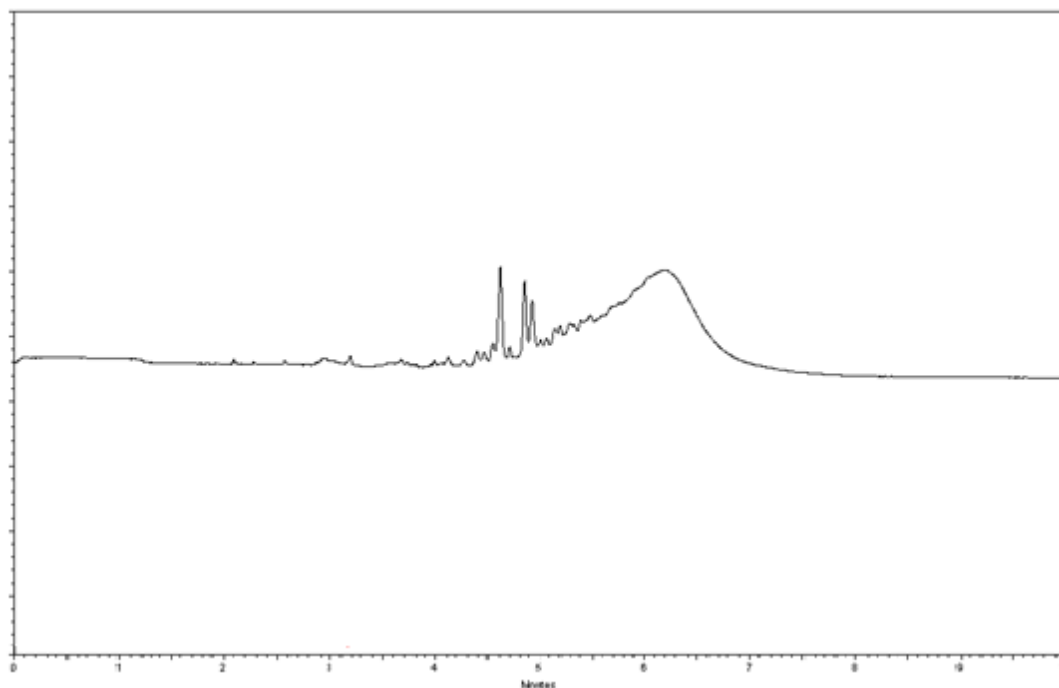


Figura18 - Eletroferograma otimizado da FAQ de *Trichilia catigua*. Condições eletroforéticas: eletroforese capilar de zona; tampão borato 80 mmol pH 8,8; capilar 75 μ m; voltagem: 20 kV a 25 $^{\circ}$ C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; FAQ: 1 mg/ml.

Métodos de caracterização de frações compostas de proantocianidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) já foram descritos na literatura, porém são de difícil desenvolvimento, pois as proantocianidinas de cadeias longas normalmente causam adesão irreversível à fase estacionária das colunas convencionais. Tal problema pode ser resolvido com o emprego de colunas diol, entretanto, tais colunas não são capazes de separar isômeros presentes nas amostras (KOUPAI-ABYAZANI et al., 1992; HELLENBRAND et al., 2015).

Outra desvantagem de CLAE para caracterização de frações polares é o alto custo das colunas empregadas, a grande utilização de solventes orgânicos e a dificuldade de desenvolvimento. Em vista disso, a eletroforese capilar apresenta como vantagem maior simplicidade de desenvolvimento, menor tempo de análise e menores quantidades de solventes empregadas, o que diminui o impacto no meio ambiente e consequentemente o custo (LECHTENBERG et al., 2004; GRAEF, 2007; LIU et al., 2008; BIZZOTTO et al., 2013).

A técnica de EC desenvolvida, mesmo após otimização dos parâmetros analíticos, não foi capaz de proporcionar total separação das substâncias presentes na FAQ de *T. catigua*. Esse fato pode ser explicado devido à alta complexidade da fração, pela presença de proantocianidinas fortemente ligadas de alto peso molecular, que podem ser observadas no tempo de migração entre 5 e 7 min, formando um aglomerado. Tais aglomerados

poliméricos em matrizes proantocianidínicas também foram relatados por Rigaud e colaboradores (1993) e Rodrigues (2007).

Contudo, a metodologia desenvolvida apresentou reprodutibilidade e potencial para caracterização e também monitoramento de separação por cromatografia líquida clássica.

5.3 SEPARAÇÃO DA FAQ DE *Trichilia catigua*

5.3.1 Cromatografia em coluna

O gel de Sephadex®-G25 não foi efetivo para o fracionamento da FAQ de catuaba pois houve eluição completa da amostra aplicada, então optou-se pelo Sephadex® LH-20 pois o mesmo apresentou melhor grau de separação.

Os dois primeiros sistemas eluentes utilizados, descritos em 4.6.2.3., não foram efetivos devido à alta afinidade da amostra pelo dioxano. No entanto, o terceiro sistema, descrito na tabela 3, apresentou melhor eficiência de separação, resultando em 24 alíquotas, que foram posteriormente aplicadas em CCD conforme seção 4.6.2.3.

Os cromatogramas obtidos podem ser observados na figura 19.

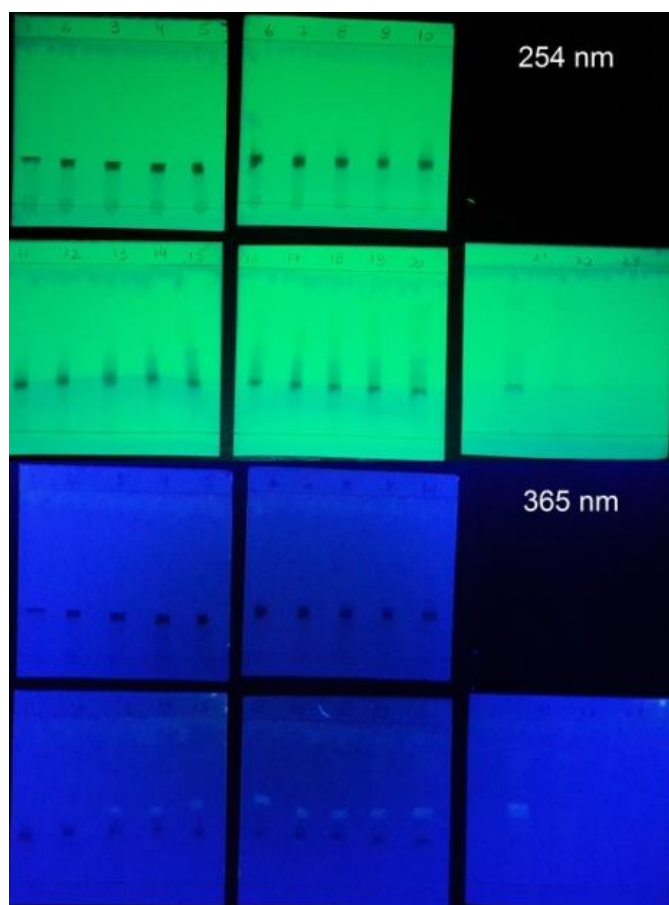


Figura 19 - CCD do fracionamento da FAQ de *Trichilia catigua* observado sob luz UV à 254 e 365 nm.

A CCD permitiu apenas um monitoramento parcial de separação, pois as amostras possuíam forte afinidade pelo gel de sílica. As frações coletadas na coluna foram reunidas de acordo com a CCD em duas subfrações, sendo elas a F1 (tubo 1 a 11) e F2 (tubo 12 a 24), com a finalidade de se obter uma separação prévia das substâncias de pesos moleculares altos e intermediários. O critério de junção empregado foi a presença de fluorescência à 365 nm. As frações foram concentradas e liofilizadas, apresentaram rendimento de 42,5 e 51,3% respectivamente. Então foram submetidas à eletroforese capilar de acordo com a metodologia definida na seção 5.2.2.9 com aumento da voltagem para 30 kV, apresentando o perfil da figura 20.

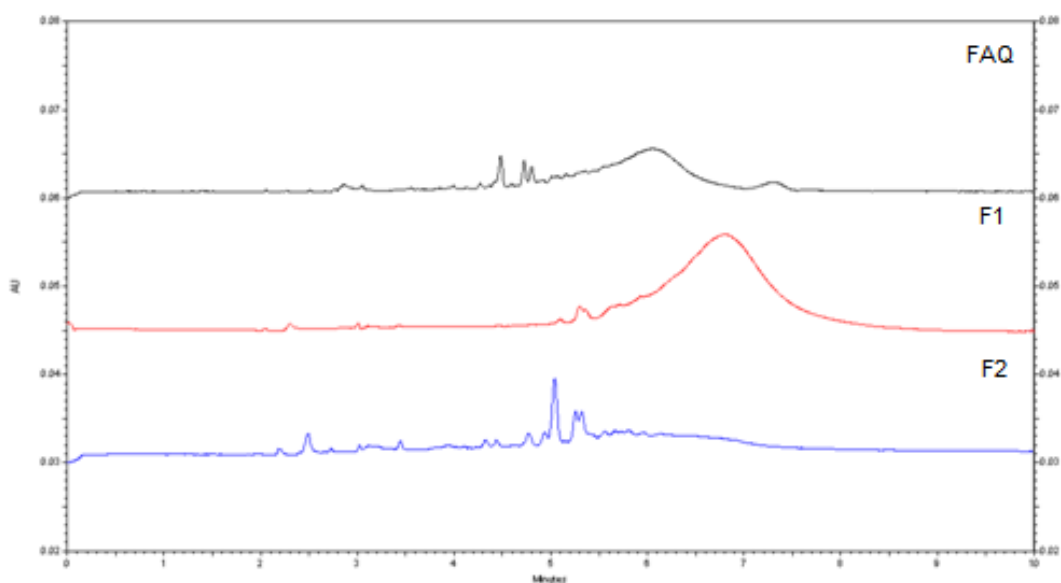


Figura 20– Eletroferogramas de FAQ, F1 e F2 de *Trichilia catigua*. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; pH 8,8; capilar 75 μ m; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; amostras à 1 mg/ml.

Ambas subfrações, F1 e F2, foram novamente aplicadas em coluna de Sephadex® LH-20, nas mesmas condições apresentadas na tabela 3. O método desenvolvido não foi capaz de separar as substâncias presentes em F1, houve obstrução da coluna com subsequente eluição total da amostra aplicada, de forma íntegra. No entanto, a fração F2 apresentou um bom perfil de separação, resultando em 25 alíquotas, que também foram monitoradas por CCD, conforme figura 21.

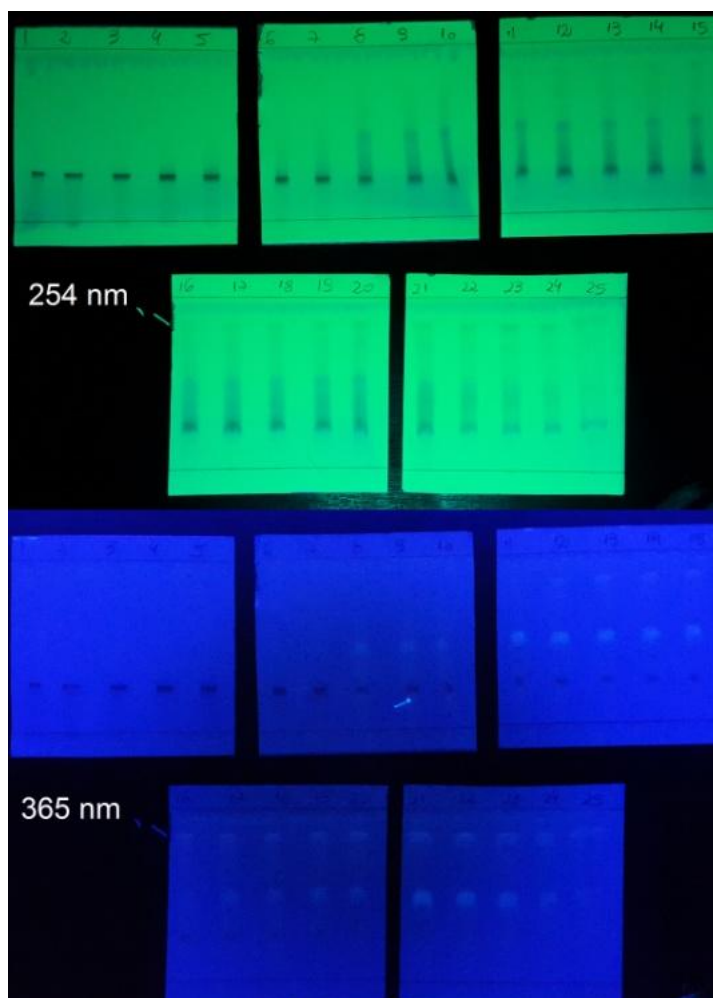


Figura 21 - CCD do fracionamento de F2 de *Trichilia catigua*, observados sob luz UV à 254nm.

As frações resultantes foram reunidas de acordo com a CCD em 3 subfrações: F2.1 (tubo 1 a 7) rendimento de 9,91%, F2.2 (tubo 8 a 11) rendimento de 24,82% e F2.3 (tubo 12 a 25) rendimento de 53,4%, que foram concentradas, liofilizadas e submetidas à eletroforese capilar (figura 22).

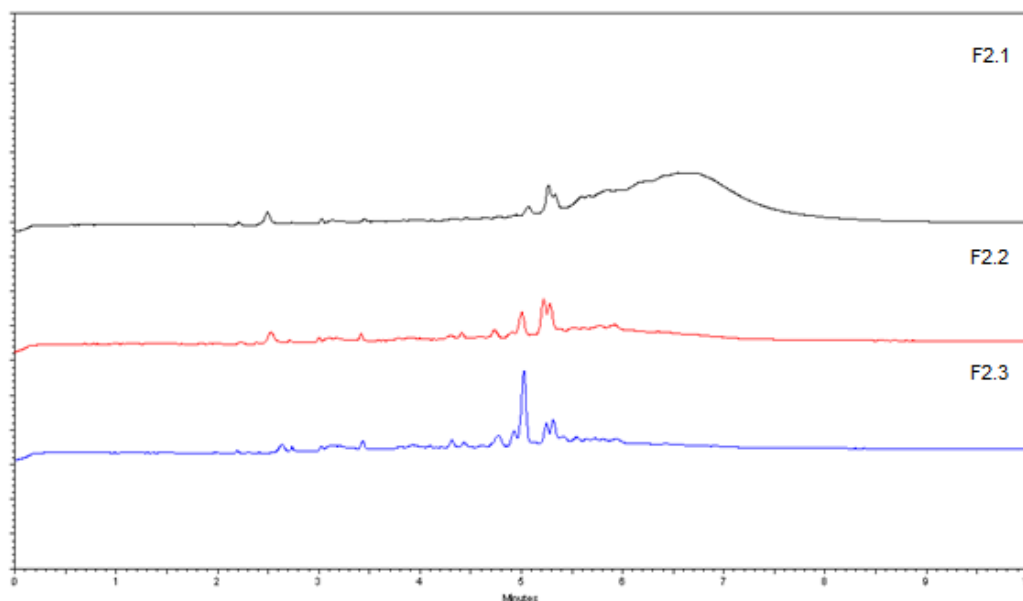


Figura 22 – Eletroferogramas das subfrações F2.1, F2.2 e F2.3 da FAQ de *Trichilia catigua*. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; pH 8,8; capilar 75 μ m; voltagem: 30 kV a 25 $^{\circ}$ C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; Amostras à 1 mg/ml.

A subfração F2.3 demonstrou melhor resultado, então foi novamente aplicada em coluna nas mesmas condições da FAQ. Porém não houve um perfil de separação efetivo. Então se empregou o sistema eluente 4, de acordo com a tabela 4, com vazão de 1,5 ml/min. Foram aplicados 1,950 g de F2.3 nos quais os tubos foram coletados de 10 em 10 ml.

O gradiente de metanol:água foi efetivo para a separação de F2.3, no qual obteve-se 58 tubos. Os perfis cromatográficos de CCD podem ser observados nas figuras 23 e 24.

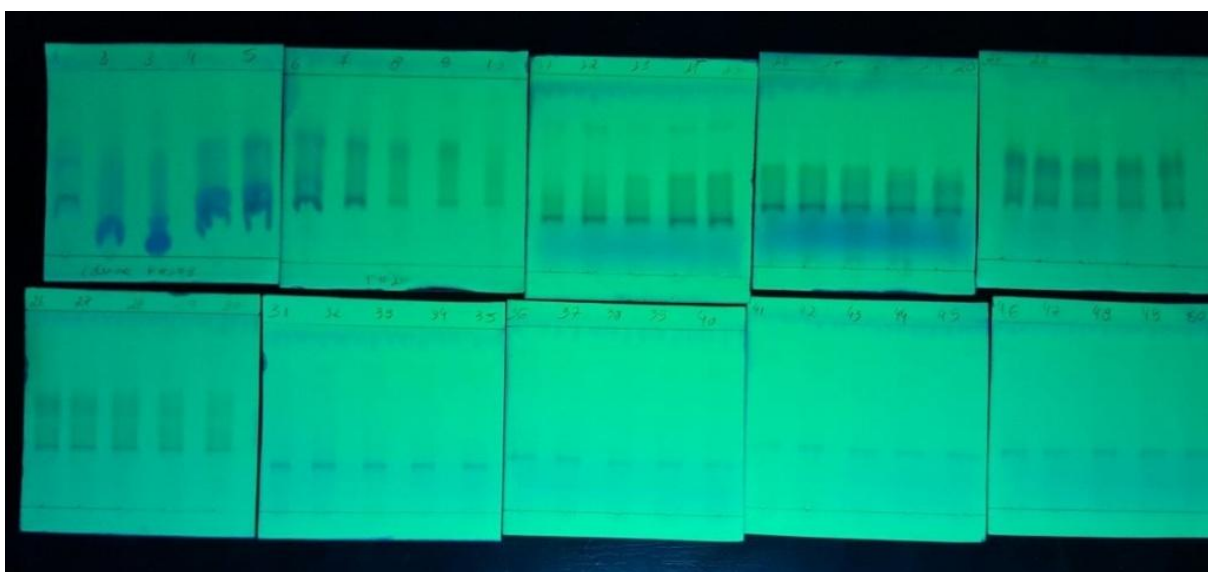


Figura 23 - CCD do fracionamento de F2.3 de *Trichilia catigua* observadosob luz UV à254nm.



Figura 24- CCD do fracionamento de F2.3 de *Trichilia catigua* observado sob luz UV à 365nm.

As amostras foram reunidas de acordo com a CCD em 16 subfrações: F2.3-1 (tubo 1), F2.3-2 (tubo 2), F2.3-3 (tubo 3), F2.3-4 (tubos 4 a 6), F2.3-5 (tubos 7 a 10), F2.3-6 (tubos 11 a 13), F2.3-7 (tubos 14 a 20), F2.3-8 (tubos 21 a 25), F2.3-9 (tubos 26 a 30), F2.3-10 (tubos 31 a 35), F2.3-11 (tubos 36 a 40), F2.3-12 (tubos 41 a 45), F2.3-13 tubos 46 a 50), F2.3-14 (tubos 51 a 56), F2.3-15 (tubo 57) e F2.3-16 (tubo 58), que foram novamente analisadas por eletroforese capilar. O rendimento das frações obtidas pode ser observado na tabela 7.

Interessante observar sobre os gradientes de fases móveis utilizadas que o dioxano inverteu a sequência de separação que ocorre normalmente no gel se Sephadex® LH-20, onde primeiramente foram eluídas as substâncias de maior peso molecular, seguida pelas demais, o que ocorreu inversamente com a aplicação do gradiente composto por metanol.

Tabela 6 - Subfrações e rendimentos da coluna de F2.3 de FAQ de *Trichilia catigua*.

Fração	Peso (g)	Rendimento (%)
1	0,0680	3,48
2	0,272	13,93
3	0,390	19,97
4	0,562	28,79
5	0,147	7,57
6	0,080	4,11
7	0,049	2,54
8	0,120	6,14
9	0,085	4,38
10	0,008	0,40
11	0,025	1,28
12	0,015	0,79
13	0,001	0,07
14	0,011	0,59
15	0,033	1,73
16	0,017	0,90
TOTAL	1,883	96,56

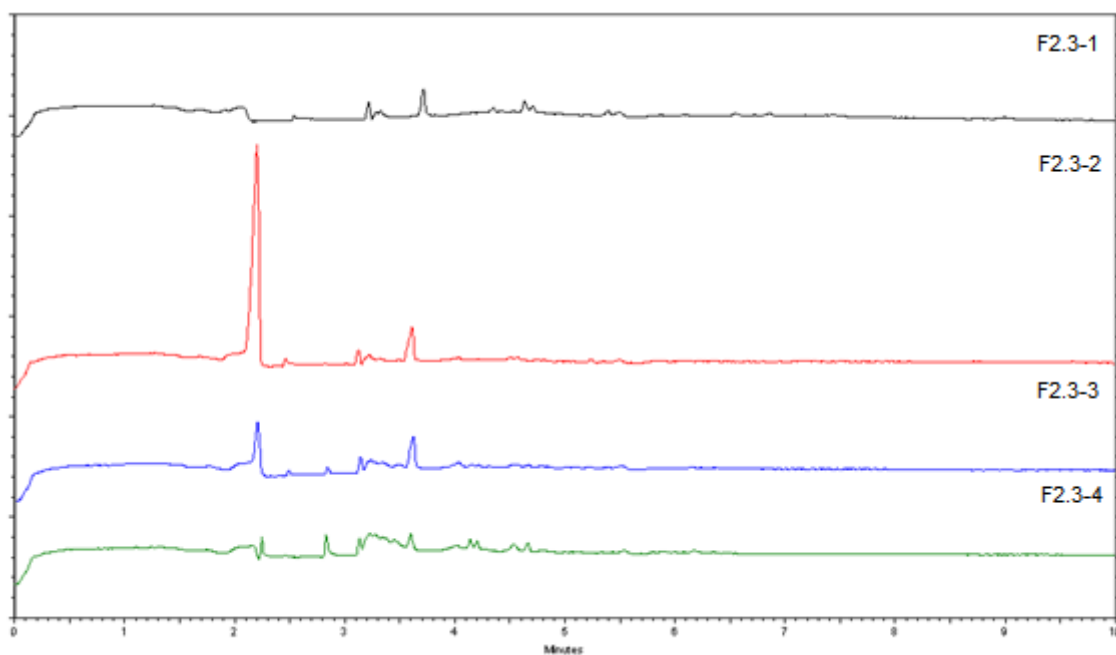


Figura 25 – Eletroferogramas das subfrações F2.3-1, F2.3-2, F2.3-3 e F2.3-4 da FAQ de *Trichilia catigua*. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol ; pH 8,8; capilar 75 μ m; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; amostras à 1 mg/ml.

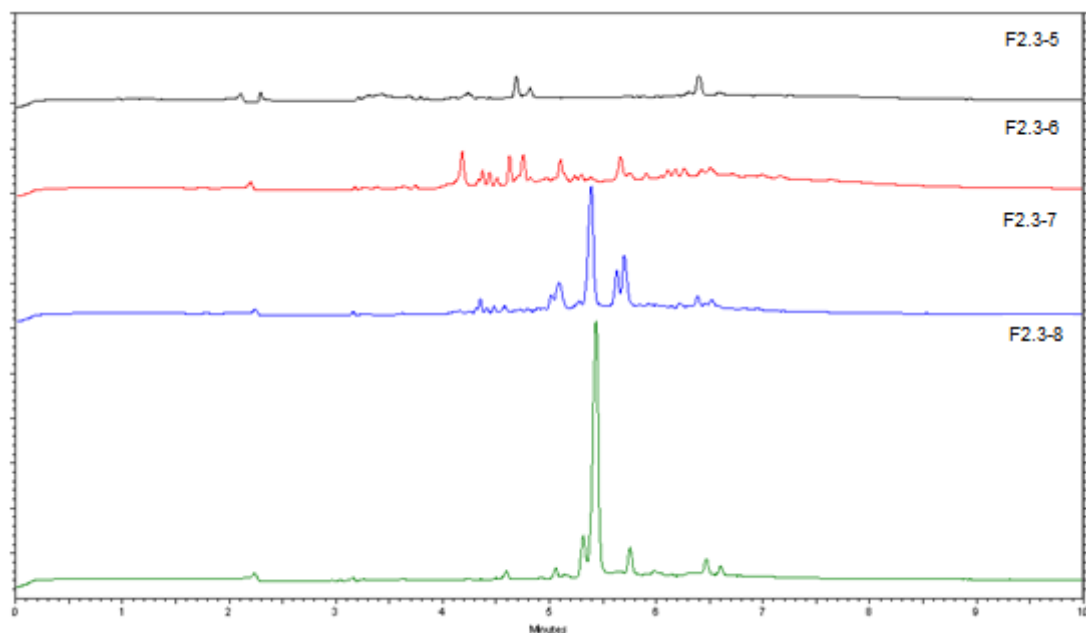


Figura 26 - Eletroferogramas das subfrações F2.3-5, F2.3-6, F2.3-7 e F2.3-8 da FAQ de *Trichilia catigua*. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; pH 8,8; capilar 75 μ m; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; amostras à 1 mg/ml.

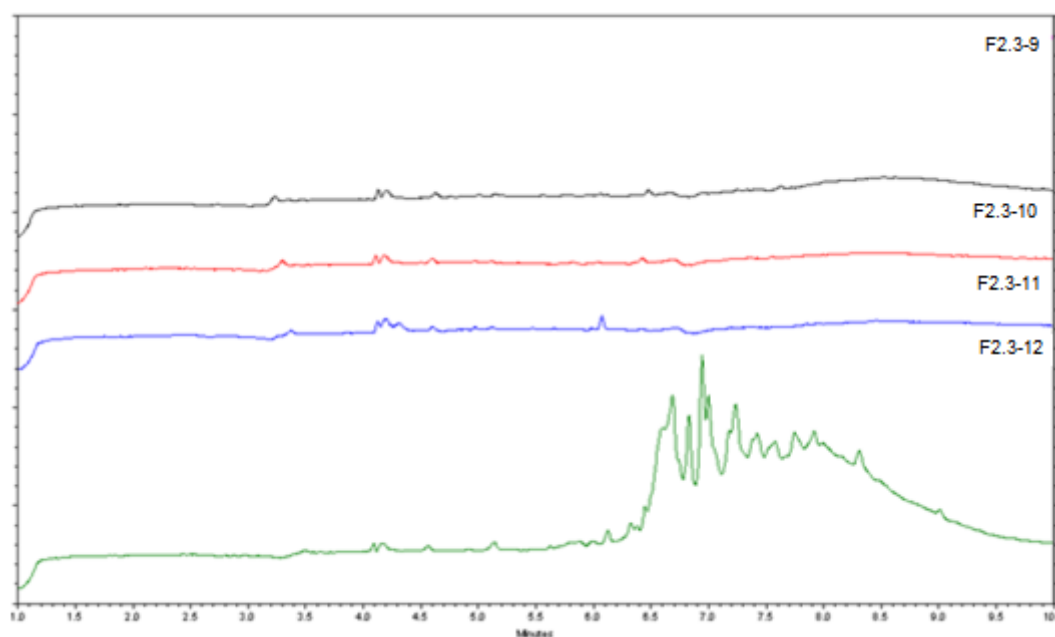


Figura 27 – Eletroferogramas das subfrações F2.3-9, F2.3-10, F2.3-11 e F2.3-12 da FAQ de *Trichilia catigua*. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; pH 8,8; capilar 75 μ m; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; amostras à 1 mg/ml.

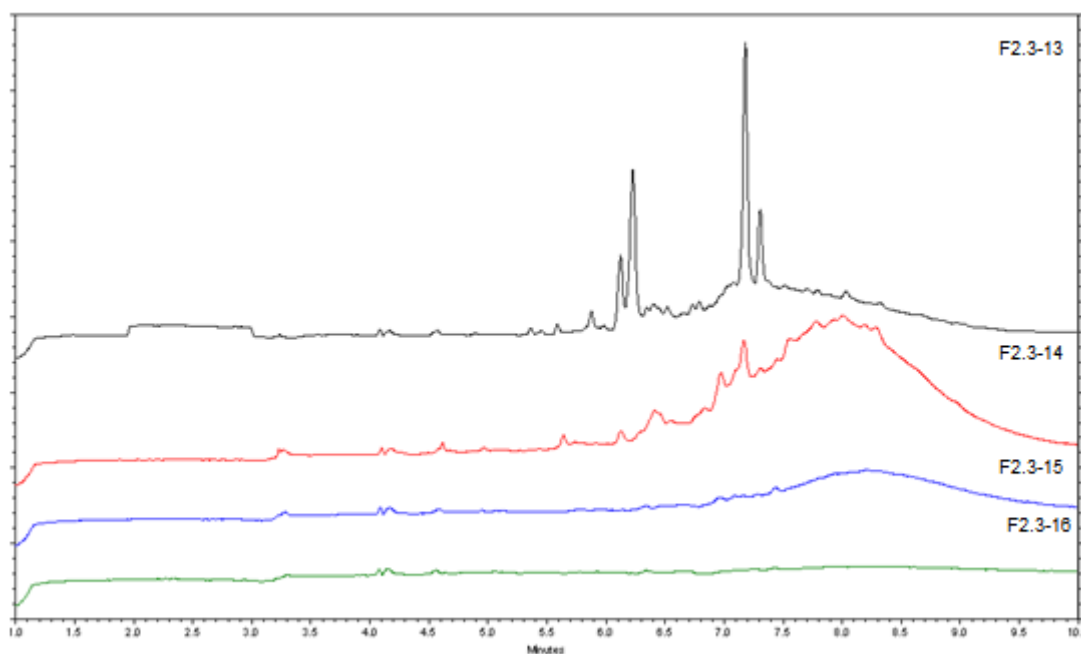


Figura 28 - Eletroferogramas das subfrações F2.3-13, F2.3-14, F2.3-15 e F2.3-16 da FAQ de *Trichiliacatigua*. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol; pH 8,8; capilar 75 μ m; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,5 psi); detecção: 214 nm; amostras à 1 mg/ml.

A figura 29 apresenta, de forma resumida, as quantidades de amostras obtidas em cada processo de particionamento em coluna, bem como seus respectivos rendimentos.

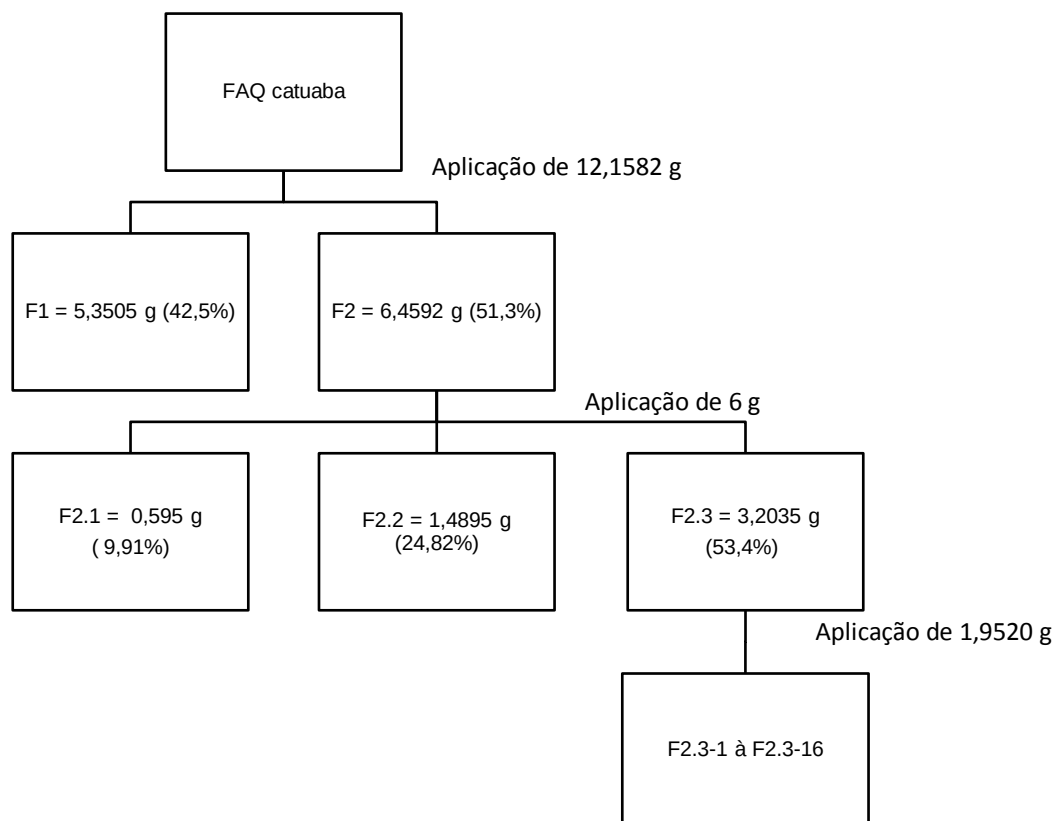


Figura 29 - Fluxograma de obtenção das sufrações de FAQ de *Trichilia catigua*.

A hidrofobicidade das proantocianidinas diminui com o aumento do grau de polimerização (GP), portanto, tais substâncias são altamente polares. A separação e elucidação são em geral muito difíceis devido à exponencial variedade de isômeros e oligômeros com diferentes GP. O tipo de cromatografia empregada depende da matriz analisada, porém métodos de cromatografia clássica empregando Sephadex® LH-20 ou Toyopearl® HW-40 têm sido geralmente aplicados a separação de procianidinas de extratos vegetais (KANTZ & SINGLETON, 1990; FAN et al., 2007; KARONEN et al., 2007). A cromatografia de exclusão pode ser utilizada como uma pré-separação preparativa, porém, no geral a separação de substâncias de alto peso molecular permanece incompleta (YANAGIDA, et al., 2003).

Não foram encontrados na literatura muitos dados específicos sobre fracionamento de matrizes proantocianidínicas, porém a complexidade de separação também foi

observada nesse trabalho, onde até o momento, nenhuma das técnicas empregadas foi capaz de promover uma total separação da amostra.

Este trabalho apresentou o primeiro estudo químico da FAQ de *T. catigua*. O emprego de técnicas de purificação ainda é necessário, porém as metodologias desenvolvidas demonstraram reprodutibilidade e foram capazes de promover o fracionamento preliminar e caracterização da FAQ de *T. catigua*.

5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados obtidos de CIM de EB, FAE e FAQ de catuaba para as cepas microbianas testadas juntamente com os antibióticos e antifúngicos de referência podem ser observados na tabela 7, e os gráficos correspondentes à análise turbidimétrica dos extratos sobre *H. pylori*, na figura 30.

Tabela 7 - Triagem microbiológica dos extratos de *Trichilia catigua* por CIM.

Micro-organismo	EB (µg/ml)	FAE (µg/ml)	FAQ (µg/ml)	PE (µg/ml)	CLA (µg/ml)	TET (µg/ml)	VAN (µg/ml)
Bactérias							
<i>S. aureus</i>	>1000	>1000	>1000	0,02	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	500	500	>1000	-	-	-	0,2
<i>P. aeruginosa</i>	>1000	>1000	>1000	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	>1000	>1000	>1000	-	-	1	-
<i>H. pylori</i>	>1000	500	>1000	-	0,5	-	-
<i>E. faecium</i>	>1000	625	>1000	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> EFRV	156,5	156,5	312,5	-	-	-	-
Leveduras							
<i>C. albicans</i>	>1000	125	>1000	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	>1000	250	>1000	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	>1000	250	>1000	-	-	-	-
Dermatófitos							
<i>T. mentagrophytes</i>	500	250	>1000	-	-	-	-
<i>T. rubrum</i>	500	500	>1000	-	-	-	-
<i>M. gypseum</i>	>1000	500	>1000	-	-	-	-

- Não determinado; PE=Penicilina; CLA=Clarithromicina; TET=Tetraciclina; VAN=Vancomicina

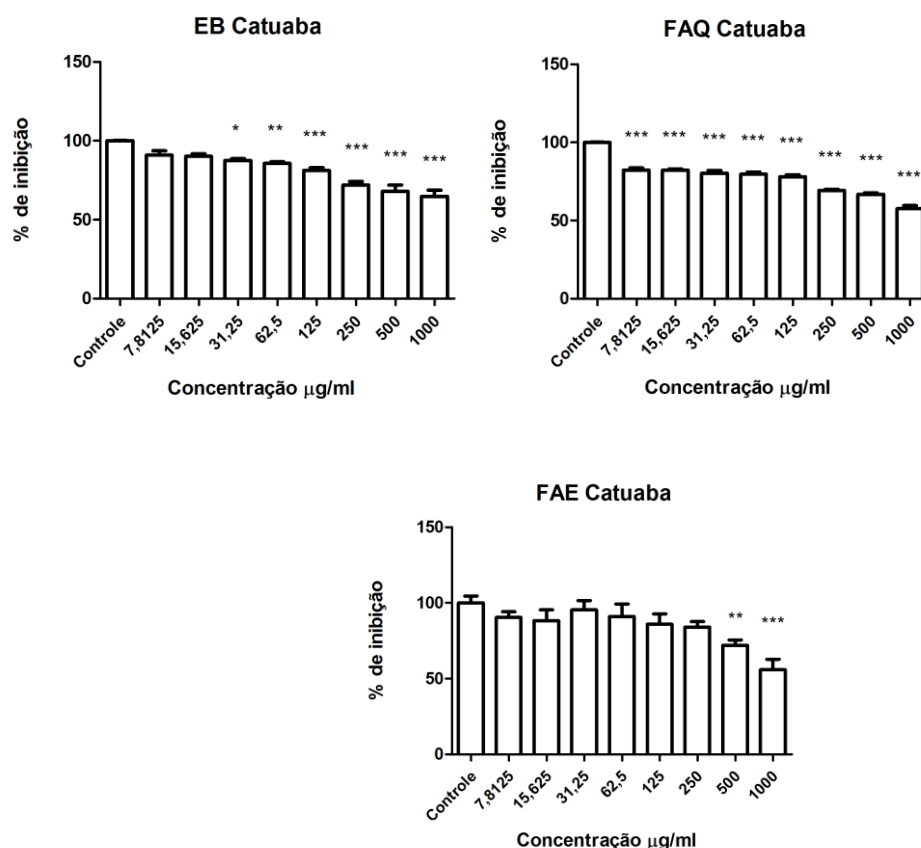


Figura 30 - Análise turbidimétrica dos extratos de *Trichilia catigua* contra *H. pylori*. Estatisticamente diferente em relação ao controle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA seguido de teste de Dunnet)

De acordo com os resultados observados na tabela 10, o EB e FAE apresentaram CIM de 500 µg/ml para *B. subtilis*, sendo que para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* tiveram CIM maior de 1000 µg/ml para os três extratos testados.

O *E. faecium* é de grande importância clínica, visto que as opções de tratamento são limitadas devido ao alto índice de resistência. Os principais medicamentos de escolha para o tratamento de bacteremias causadas por EFRV são a daptomicina e a linezolida, porém são medicamentos com baixa janela terapêutica e grande índice de efeitos tóxicos, principalmente a linezolida, que além de bacteriostática, apresenta toxicidade medular e neuropatia periférica com o uso prolongado (DIAZGRANADOS et al., 2005; MAVE et al., 2009; MCKINNELL et al., 2011; KRAFT et al., 2011). O EB e FAE de *T. catigua* apresentaram CIM de 156,5 e a FAQ de 312,5 µg/ml para o isolado clínico de *E. faecium*, e como pode ser observado quadro 2 (página 56), tal cepa apresenta resistência aos antimicrobianos normalmente utilizados.

A suscetibilidade de *E. faecium* aos extratos de catuaba pode ser decorrente de um fenômeno denominado sensibilidade colateral. Tal fenômeno parte do princípio no qual a resistência é gerada após a exposição dos micro-organismos aos agentes antimicrobianos (NIEDERMAN, 2003; BAL et al., 2010), e o desenvolvimento de tais resistências pode levar

a uma perturbação no perfil de suscetibilidade da célula. Essa adaptação resulta em sensibilidade a outras drogas por meio da perturbação da rede de expressão gênica, afetando a vulnerabilidade da célula a agentes antimicrobianos (LIU et al., 2010; IMAMOVIC & SOMMER, 2013). Devido ao desenvolvimento de resistência a diversos medicamentos a atividade encontrada nesse trabalho pode ser decorrente do fato de o isolado clínico de *E. faecium* ter se tornado suscetível a precipitação de proteínas de membrana, causada pelos taninos, gerando lise da mesma. Estudos dos possíveis mecanismos de ação se fazem necessários, porém os extratos de catuaba apresentam potencial para tratamento e desenvolvimento de novas estratégias contra *E. faecium*.

A FAE apresentou CIM de 500 µg/ml para *H. pylori*, onde posteriormente foi realizada a avaliação de atividade bactericida, na qual somente a FAE apresentou morte celular na concentração de 1000 µg/ml, sendo que para concentrações inferiores e também para os outros extratos, houve crescimento confluyente, sugerindo atividade bacteriostática. Para melhor avaliação da inibição da viabilidade celular, as placas foram lidas em leitor de microplacas a 560nm.

Segundo a análise turbidimétrica, que pode ser observada na figura 30, o EB apresentou resultados relevantes de inibição de *H. pylori* a partir de 31,25 µg/ml, a FAE a partir de 500 µg/ml e a FAQ apresentou resultados mais consistentes, significativos a partir de 7,81 µg/ml.

Os polifenóis têm apresentado atividade antimicrobiana sobre a *H. pylori*. Burger e colaboradores (2000) demonstraram que proantocianidinas presentes no extrato de *Vaccinium macrocarpon* Aiton (Ericaceae) inibem a adesão da *H. pylori* na mucosa gástrica, indicando um potencial papel na prevenção de úlceras pépticas. Eles associaram que os polifenóis inibem a ligação da adesina da bactéria *H. pylori* com o ácido siálico.

Pastene e colaboradores (2009b) realizaram um estudo para verificar a associação entre grau de polimerização dos polifenóis presentes na casca da maçã e inibição da urease da *H. pylori*. Os autores verificaram que os polifenóis de alto peso molecular são os principais constituintes associados com a inibição da urease da bactéria. Outro estudo realizado por Pastene e colaboradores (2010a) confirmou os resultados, posteriormente, o mesmo grupo investigou efeitos dos polifenóis frente à vacuolização nas células epiteliais cervicais humanas, com efeito significativo.

O extrato rico em polifenóis também apresentou um efeito antiadesivo *in vitro* contra *H. pylori*. Em um modelo de infecção de curto prazo (20 dias) em ratos C57BL6/J, nas concentrações 150 e 300 mg/kg/dia, o extrato de maçã demonstrou um efeito inibitório sobre a fixação *H. pylori*. A administração do extrato também apresentou efeito anti-inflamatório e redução dos níveis de malondialdeído, sem apresentar lesões nos animais tratados (PASTENE et al, 2010b). Os resultados encontrados por tais autores foram consistentes

com os verificados nesse trabalho, onde a FAQ, que é composta majoritariamente por polifenóis de alto peso molecular, mostrou bons resultados. Estudos relativos à atividade dos extratos de catuaba sobre os fatores de virulência da *H. pylori* ainda se fazem necessários, porém a FAQ de *T. catigua* apresenta potencial para tratamento dessa bactéria.

Para os fungos dermatófitos, o EB apresentou CIM de 500 µg/ml para *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, a FAE teve CIM de 250 µg/ml para *T. mentagrophytes* e 500 µg/ml para *T. rubrum* e *M. gypseum*. Conforme observado, a FAE também obteve melhor resultado.

Com relação às leveduras, resultados interessantes foram observados com a FAE, que apresentou CIM de 250 µg/ml para *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Porém o resultado mais expressivo pode ser observado para *C. albicans*, no qual o CIM da FAE foi de 125 µg/ml. A FAE também apresentou melhores resultados no trabalho desenvolvido por Ayensu e Quartey (2015), que avaliaram o potencial antimicrobiano de *Trichilia tessmannii* Harms onde encontraram um CIM de 635 µg/ml para *C. albicans*. Os autores atribuíram a atividade da fração acetato às substâncias de média polaridade que compõe majoritariamente o extrato.

Avaliou-se também a capacidade da FAE de Catuaba de se ligar diretamente ao ergosterol das leveduras através do método de determinação da concentração inibitória mínima adicionando-se ergosterol exógeno ao meio. Foi possível observar que não foram alterados os valores de CIM contra as três cepas de *Candida*, indicando não existir ligação do mecanismo de ação da FAE com a molécula de ergosterol. Análises complementares são necessárias para elucidar os possíveis mecanismos de ação do extrato sobre a levedura e também testes de citotoxicidade com linhagens celulares humanas.

O mecanismo de ação específico dos taninos sobre as leveduras do gênero *Candida* ainda não foi estabelecido, entretanto sugere-se que esteja relacionado à habilidade de tais substâncias de precipitarem proteínas (HASLAM, 1996; VASCONCELOS et al., 2003).

Estudos indicam que substâncias fenólicas possuem atividade contra uma vasta gama de micro-organismos principalmente os taninos, cuja atividade está relacionada à inativação de fatores de aderência, enzimas e proteínas do invólucro celular (COWAN, 1999; BAZRAFSHAN et al., 2013).

A FAE de *T. catigua* apresentou atividade antimicrobiana melhor quando comparada ao EB e FAQ contra micro-organismos Gram-positivos. A atividade antimicrobiana de extratos vegetais predominante sobre cepas Gram-positivas já foi relatada por vários autores. Nostro e colaboradores (2000) atribuíram essa maior atividade ao fato de que a monocamada de peptideoglicano confere uma barreira de permeabilidade menor do que as Gram-negativas, nos quais a parede celular é composta por lipopolissacarídeos hidrófilos

que bloqueiam a entrada de substâncias hidrofóbicas presentes em extratos vegetais (KELMANSON et al., 2000; PIZZOLATI et al., 2002; BEZIK et al., 2003; ZONGO et al., 2010; DJEUSSI et al., 2013; SARANRAJ & SIVASAKTHI, 2014; KONATE et al., 2015). Entretanto, os extratos de catuaba, principalmente a FAQ, também apresentaram atividade sobre *H. pylori*, o que é um fato interessante quando o caráter Gram-negativo da bactéria é levado em consideração.

Como observado na tabela 10, os extratos apresentaram atividade antimicrobiana inferior aos fármacos de referência. Contudo, deve ser levado em consideração que os fármacos testados são compostos de apenas uma substância, isolada e caracterizada e que os extratos de catuaba são compostos de centenas de substâncias, que estão presentes em quantidades muito baixas, portanto, em tais extratos existem substâncias com forte atividade antimicrobiana, que podem estar agindo de forma isolada ou em sinergismo com outras, formando fitocomplexos.

Com o aumento dos índices de resistências, medicamentos com sítios alvo diferentes dos convencionais estão cada vez mais escassos, então, a associação de fármacos pode ser considerada uma estratégia viável. Entre os benefícios do sinergismo destacam-se o aumento da eficácia, segurança, tolerabilidade e redução do desenvolvimento de resistência (LEWIS & KONTOYIANNIS, 2001; MUKHERJEE et al., 2005). Mais análises são necessárias, porém, de um modo geral os extratos de *T. catiguasão* candidatos promissores como adjuvantes ao tratamento e também para desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos.

6 CONCLUSÕES

Os extratos e frações preparadas apresentaram potencial antioxidante, que é relacionado ao teor de polifenóis totais.

O espectro de RMN ^{13}C em estado sólido sugeriu a presença de polifenóis de alto peso molecular na FAQ, composto por proantocianidinas e cinchonaínas do tipo I e II.

Os métodos cromatográficos desenvolvidos nesse trabalho foram capazes de promover uma separação parcial e caracterizar a fração aquosa.

O método de eletroforese capilar se mostrou reprodutível e de importância para o monitoramento de separação da fração aquosa por coluna contendo Sephadex® LH-20.

A triagem microbiológica apresentou resultados moderados relacionados à FAE frente às bactérias Gram-positivas avaliadas e a FAQ também se mostrou efetiva contra a bactéria Gram-negativa *Helicobacter pylori*.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, G. R.; AYALA, G.; FIERROS-ZARATE, G. *Helicobacter pylori*: recent advances in the study of its pathogenicity and prevention. **Salud pública de México**. v.43 (3), p. 237-247, 2001.
- AHMAD, I.; BEG, A. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drugs resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**. v.74, p.113-123, 2001.
- AHUJA, S.; JIMIDAR, M. H. **Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis**. Oxford: Elsevier, 2008. 529 p. (Series Separation Science and Technology).
- ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C. M. O. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, p.117-126, 2008.
- ALTRIA, K. V. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 856, p. 443-463, 1999.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL B.; WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**. v.84, p. 551-562, 2004.
- ANTUNES, E; GORDO, W. M.; DE OLIVEIRA, J. F.; TEIXEIRA, C.E.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama and its constituents. **Phytotherapy Research**. v.15, p.416-421, 2001.
- ARENDROP, M. C.; FUURSTED, K.; GAHRN-HANSEN, B.; JENSEN, I. M.; KNUDSEN, J. D.; LUNDGREN, B.; SCHONHEYDER, H. C.; TVEDE, M. . Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, p. 4434–4440, 2005.
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**. v.10, p.266-278, 2012.
- ARTHUR, M.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. Glycopeptide resistance in enterococci. **Trends Microbiology**. v.4, p.401–407, 1996.
- ARIDOGAN, I. A.; IZOL, V.; ILKIT, M. Superficial fungal infections of the male genitalia: a review. **Critical Review Microbiology**. v.37, p. 237–244, 2011.
- AYENSU, I.; QUARTEY, A. K. Antimicrobial activities of the stem bark of *Trichilia tessmannii* (harms) and *Trichilia monadelpha* (thonn) J. J. de wilde both of the family Meliaceae. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v.4(9), p. 1352-1362, 2015.
- BAIS, H. P.; FALL, R.; VIVANCO, J. M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**. v. 134, p. 307–319, 2004.
- BAKER, D. R. *Capillary Electrophoresis*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995. 244 p.
- BAL, A. M.; KUMAR, A.; GOULD, I. M. Antibiotic heterogeneity: From concept to practice. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1213, p. 81–91, 2010.

- BARBOSA, N.R.; FISCHMANN, L.; TALIB, L.L.; GATTAZ, W.F. Inhibition of platelet phospholipase A2 activity by catuaba extract suggests anti-inflammatory properties. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 942-944, 2004.
- BASSANI, V. L.; GONZALEZ, O.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos. **Fitos**. v.1(1), 2005.
- BASU, S.; GUGNANI, H.; JOSHI, S.; GUPTA, N. Distribution of *Candida* species in different clinical sources in Delhi, India, and proteinase and phospholipase activity of *Candida albicans* isolates. **Revista Iberoamericana de Micología**. v.20(4), p.137–140, 2003.
- BAZRAFESHAN, E.; MOSTAFAPOUR, F. K.; MANSOURIAN, H. J. Phenolic compounds: health effects and its removal from aqueous environments by low cost adsorbents. **Health Scope**. v. 2, p.65–66, 2013.
- BRANDA, S. S.; GONZALEZ-PASTOR, J. E.; BEN-YEHUDA, S.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 98, p. 11621–11626, 2001.
- BELTRAME, F. L.; CASS, Q. B.; FILHO, E. R.; BARROS, F.; CORTEZ, D.A.G.; Análisis de productos fitoterapéuticos comerciales de “catuaba” por LC-UV-MS. **Noticias Técnicas del Laboratorio**, v. 3, p. 14-16, 2004.
- BELTRAME, F. L.; RODRIGUES FILHO, E.; BARROS, F. A. P.; CORTEZ, D. A. G.; CASS Q. B. A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as catuaba. **Journal of Chromatography A**. v.1119, p. 257 – 263, 2006.
- BENENCIA, F.; COURRÈGES, M. C., COULOMBIÉ, F. C. Anti-inflammatory activities of *Trichilia glabra* aqueous leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v 71, p. 293-300, 2000.
- BEZIC, N.; SKOCIBUSI, M.; DUNKIC, V.; RADONIC, A. Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. **Phytotherapy Research**. v.17, p.1037–1040, 2003.
- BIASOLI, M. S.; TOSELLO, M. E.; BOTTAI, H.; CUESTA, C.; MAGARÓ, H. M. Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. **Mycoses**. v. 45, p.465–469, 2002.
- BIZZOTTO, C. S.; MEINHARDT, A. D.; BALLUS, C. A.; GHISELLI, G.; GODOY, H. T. Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for caffeine determination in decaffeinated coffee. **Food Science and Technology**. v.33, p.186-191, 2013.
- BLANCO, J. L.; GARCIA, M. E. Immune responses to fungal infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 125, p. 47-70. 2008.
- BOGORNÍ, P. C.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Neotropical Entomology**. v. 32 (4), p. 665-669, 2003
- BONASSOLI, L. A.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T. I. High frequency of *Candida* parapsilosis on the hands of healthy hosts. **Journal of Hospital Infection**. v.59, p.159–162, 2005.

- BONASSOLI V. T.; CHASSOT, J. M.; LONGHINI, R.; MILANI, H.; MELLO, J. C. P.; OLIVEIRA, R. M. W. Subchronic administration of *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction promotes antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 143, p. 179-187, 2012.
- BOUZA, E.; MUÑOZ, P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 32, p. 87-91, 2008.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**. v. 56 (11), p. 317-333, 1998.
- BRANDL, K.; PLITAS, G.; MIHU, C. N.; UBEDA, C.; JIA, T.; FLEISHER, M.; SCHNABL, B.; DEMATTEO, R. P.; PAMER, E. G. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. **Nature**. v. 455, p. 804-807, 2008.
- BREIDENSTEIN, E. B.; DE LA FUENTE-NUNEZ, C.; HANCOCK, R. E. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**. v. 19, p. 419-426, 2011.
- BURGER, O.; OFEK, I.; TABAK, M.; WEISS, E.; SHARON, N. A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. **Immunology & Medical Microbiology**. v. 29, p. 295-301, 2000.
- CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A. Herbal Catuama induces endothelium dependent and independent vasorelaxation action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 32-38, 1997.
- CAMPOS, M. M.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; BORTOLANZA, L. B.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Pharmacological and neurochemical evidence for antidepressant-like effects of the herbal product Catuama. **Pharmacol Biochemistry Behavior**. v. 78, p. 757-764, 2004.
- CAMPOS, M. M.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Antidepressant-like effects of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract: evidence for dopaminergic-mediated mechanisms. **Psychopharmacology**. v. 182, p. 45-53, 2005.
- CAÑINGUER, S.; DELLACASSA, E.; BANDONI, A. L. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿indicadores de dependencia o factores de desarrollo?. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 22, p. 265-278, 2003.
- CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, p. 520-535, 2007.
- CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality?. **Brazilian Journal of Infection Diseases**. v. 9, p. 70-6, 2005.
- CHASSOT, J. M.; LONGHINI, R.; GAZARINI, L.; MELLO, J. C. P.; DE OLIVEIRA, R. M. W. Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 137, p. 1143-1148, 2011.
- CHEN, J.; ZHU, H.; CHU, V. M.; JANG, Y. S.; SON, J. Y.; KIM, Y. H.; SON, C. G.; SEOL, I.C.; KANG, J. S. Quality control of a herbal medicinal preparation using high-performance liquid

- chromatographic and capillary electrophoretic methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 55, p. 206-210, 2011.
- CHEN, S. C. A.; MARRIOTT, D.; PLAYFORD, E. G.; NGUYEN, Q.; ELLIS, D.; MEYER, W.; SORRELL, T. C.; SLAVIN, M. Candidaemia with uncommon *Candida* species: predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management. **Clinical Microbiology and Infection**. v.15, p. 662-669, 2009.
- CHEUNG, H.; ZHANG, Q. Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in *Prunella vulgaris* L. by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers. **Journal of Chromatography A**. v.1213, p. 231-238, 2008.
- CHU, Q.; LIN, M.; YU, X.; YE, J. Study on extraction efficiency of natural antioxidant in coffee by capillary electrophoresis with amperometric detection. **Food Research and Technology**. v. 226, p.1373-1378, 2008.
- CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**. v. 40, p.809-816, 2005.
- CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standards- 6 th ed. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement M100-S16 (tab 2J). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, M07-A8. 8th edition Wayne, PA., 2011.
- COELHO, L. G. V.; ZATERKA, S. Federação Brasileira de Gastroenterologia e Núcleo Brasileiro para o Estudo de *Helicobacter*. II Consenso Brasileiro sobre *Helicobacter pylori*. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 42 (2), p. 128-132, 2005.
- COL, A. P.; SAVI, D. C.; ONOFRE, S. B. Identificação das leveduras do gênero *Cândida* pelo método cromógeno CHRMAGAR: *Cândida* obtidas de pacientes com infecções das vias urinárias. **Revista Brasileira de análises clínicas**. v.41(4), p.279-281, 2009.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B. F.; MONFARDINI, L. P. D. A.; CUNHA, A. K. B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective Observational Study of Candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence Rate, Epidemiology, and Predictors of Mortality. **Infection Control & Hospital Epidemiology**. v. 28, p. 570–576, 2007.
- COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44 (8), p. 2816-2823, 2006.
- COSTA, A. F. Farmacognosia. 6ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.3, 906 p. II, 2002.
- COWAN, S. T. A review of names for coliform organisms. **Internation Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy**. v. 4, p. 119–124, 1954.

- COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Review**. v.12, p. 564–582, 1999.
- CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, p. 26–38, 2010.
- CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia. Lisboa: **Fundação Calouste Gulben Kian**. 2003. p.38
- CZOCHANSKA, Z.; FOO, L. Y.; NEWMAN, R. H.; PORTER, L. J.; THOMAS, W. A.; JONES, W. T. Direct proof of a homogeneous polyflavan-3-ol structure of polymeric proanthocyanidins. **Journal of the Chemical Society, Cemical Communications**. p. 375-377, 1979.
- DE BRUYNE T.; PIETERS L.; DEELSTRA H.; VLIETINCK A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 27, p. 445-449, 1999.
- DEBROY, C.; ROBERTS, E.; FRATAMICO, P. M. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. **Animal Health Research Reviews**. v.12, p. 169–185, 2011.
- DEGREEF, H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). **Mycopathologia**. v.166, p.257-265, 2008.
- DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. **Internation Journal of Microbiology**. v. 2014, p.1–6, 2014.
- DEUSTSCHES ARZNEIBUCH. 9. ed., Stuttgart: wissenschaftliche, 1986.
- DIAS, M. F.; BERNARDES-FILHO, F.; QUARESMA-SANTOS, M. V.; AMORIM, A. G.; SCHECHTMAN, R. C.; AZULAY, D. R. Treatment of superficial mycoses: review - part II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 88, p. 937-44, 2013.
- DIAZGRANADOS, C.A.; ZIMMER, S.M.; KLEIN, M.; JERNIGAN, J.A. Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bloodstream infections: a meta analysis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 41, p. 327-33 , 2005.
- DJEUSSI, D. E.; NOUMEDEM, J. A.; SEUKEP, J. A.; FANKAM, A. G.; VOUEKENG, I. K.; TANKEO, S. B.; NKUETE, A. H.; KUETE, V. Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 13, p. 164, 2013.
- DUCKE A. A catuaba na botânica sistemática científica e pseudo-científica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 47 (5), p. 267-271, 1966.
- DUNN B. E.; COHEN, H; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori*. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 10, p. 720–741, 1997.
- DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**. 26p, 2016.
- EECKHAUT, A. V.; MICHOTTE, Y. *Chiral separations by capillary electrophoresis*. Boca Raton: CRC Press, 2010. 526p. (Chromatographic Science Series).

- ELDIN, S.; DUNFORD, A. Fitoterapia na atenção primária à saúde. São Paulo: Manole, 2001.
- ESCHERICH, T.; BETTELHEIM, K. S. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. **Reviews of Infections Diseases**. v.10, p. 1220–1225, 1988.
- ESPADA, S. F.; FACCIN-GALHARDI, L. C.; RINCAO, V. P.; BERNARDI, A. L.; LOPES, N.; LONGHINI, R.; MELLO, J. C. P, LINHARES, R. E.; NOZAWA, C. Antiviral activity of *Trichilia catigua* bark extracts for *Herpesvirus* and *Poliovirus*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v. 16, p. 724-732, 2015.
- ESPINEL-INGROFF, A.; CANTON, E.; PEMAN, J.; RINALDI, M. G.; FOTHERGILL, A. W. Comparison of 24-hour and 48-hour voriconazole MICs as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution method (M27–A3 document) in three laboratories: results obtained with 2,162 clinical isolates of *Candida* spp. and other yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, p. 2766–2771, 2009.
- EVANS, C. E.; STALCUP, A. M. Comprehensive strategy for chiral separations using sulfated cyclodextrins in capillary electrophoresis. **Chirality**. v. 15, p. 709-723, 2003.
- FALAGAS, M. E.; ROUSSOS, N.; VARDAKAS, Z. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. **International Journal of Infection Disease**. v.14 (11), p. 954-966, 2010.
- FAN, J., DING, X., GU, W., Radical-scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed. **Food Chemistry**. v.102, p.168 – 177, 2007.
- FARMACOPEIA Brasileira. 5.ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2010.
- FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1929, p.194.
- FARMACOPEIA Européia. 4 ed. França:EDQM, 2002.
- FOO, L. Y.; LU, Y.; HOWEL, A. B.; VORSA, N. The structure of cranberry proanthocyanidins wich innibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* *in vitro*. **Phytochemistry**. v. 54, p. 173-181, 2000.
- FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v. 61 (2), p. 201-208. 2008.
- GALLOWAY-PEÑA, J. R.; NALLAPAREDDY, S. R.; ARIAS, C. A.; ELIOPOULOS, G. M.; MURRAY, B. E. Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. **Journal of Infection Diseases**. v. 200, p.1566-1573, 2009.
- GAYNES, R.; EDWARDS, J. R. Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. **Clinical Infection Diseases**. v. 41, p. 848-854, 2005.
- GILMORE, M. S.; FERRETTI, J. J. Microbiology. The thin line between gut commensal and pathogen. **Science**. v. 299, p.1999-2002, 2003.
- GIRI, S.; KINDO, A. J. A review of *Candida* species causing blood stream infection. **Indian Journal of Medical Microbiology**. v.30 (3), p.270–278, 2012.

- GOODWIN, C. S.; MCCULLOCH, R. K.; ARMSTRONG, J. A.; WEE, S. H. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultra structure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. **Journal of Medical Microbiology**. v.19, p.257–267, 1987.
- GOW, N. A. R.; VAN DE VEERDONK, F. L.; BROWN, A. J. P.; NETEA, M. G.. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**. v.10, p.112–122, 2012.
- GRAEF, L. E.; 2007. Desenvolvimento e validação de um método analítico quantitativo por eletroforese capilar para tuberculostáticos de primeira escolha. 108f. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas] Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- GRAYSON, M. L.; ELIOPOULOS, G. M; WENNERSTEN, C. B; RUOFF, K. L.; GIROLAMI, P. C. DE; FERRARO, M. J.; MOELLERING, R. C. JR. Increasing resistance to β -lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: a 22-year review at one institution. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 35, p. 2180-2184, 1991.
- GREENWOOD, D.; SLACK, R. C. B.; PEUTHERER, J. F. Medical microbiology. A guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control. 17 ed, Churchill Livingstone, London. 2007.
- GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**. v. 166, p. 353-367, 2008.
- GUTERRES, S. B. *Estudo dos extratos dos frutos de Sapindus saponaria* enriquecidos em saponinas e outros glicosídeos e sua aplicação em eletroforese capilar. 2005. 90 f. Dissertação [Mestrado em Química Analítica] Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2005.
- HA, J. F.; ITALIANO, C. M.; HEATH, C. H.; SHIH, S.; REA, S.; WOOD, F. M. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. **Burns**. v. 37, p. 181-195, 2010.
- HAMON, M. A.; LAZAZZERA, B. A. The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**. v. 42, p. 1199–1209, 2001.
- HAVLICKOVA, B.; CZAICA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**. v. 51, p. 2–15, 2008.
- HARWOOD, C. R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends Biotechnology**. v. 10, p. 247–256, 1992.
- HASLAM, E. Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. Cambridge University Press, 1989.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-15, 1996.
- HEEGAARD, N. H. H.; NILSSON, S.; GUZMAN, N. A. Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments. **Journal of Chromatography B**, v. 715, p. 29-54, 1998.
- HELLENBRAND, N.; LECHTENBERG, M.; PETEREIT, F.; SENDKER, J.; HENSEL, A. Isolation and quantification of oligomeric and polymeric procyanidins in the aerial parts of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). **Planta Medica**. v. 81, p.1175-1181, 2015.

- HERNANDEZ-CASTRO, R.; ARROYO-ESCALANTE, S.; CARRILLO-CASAS, E. M.. Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. **Journal of European Pediatrics**. v. 169, p. 783–787, 2010.
- HIDRON, A. I.; EDWARDS, J. R.; PATEL, J.; HORAN, T. C.; SIEVERT, D. M.; POLLOCK, D. A.; FRIDKIN, S. K. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 29, p. 996-1011, 2008.
- HINRICHSSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, p. 394-398, 2008.
- HOWDEN, B. P.; DAVIES, J. K.; JOHNSON, P. D.; STINEAR, T. P.; GRAYSON, M. L. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**. v.23, p.99–139, 2010.
- HU, B.; MARTIN, L. M. Capillary electrophoresis of peptides and proteins. In: MILLNER, P.A. (Ed.). **High Resolution Chromatography: A Practical Approach**. New York: Oxford University Press, 1999. p. 77-116. The Practical Approach Series.
- IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agriculture, Food and Chemistry**, v. 51, p.1811–1815, 2003.
- IMAMOVIC, L.; SOMMER, M. O. A. Use of collateral sensitivity networks to design drug cycling protocols that avoid resistance development. **Science Translational Medicine**. v. 5 (204), p. 204-2014, 2013.
- ITO, L. A. Desenvolvimento de metodologia analítica por eletroforese capilar para isolar, identificar e quantificar cafeína e flavan-3-ol em extrato de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke – Sapindaceae. 133 f. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas] Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2011.
- JOLY, A. B. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal 12. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. p. 408-410.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. Plant systematic. A phylogenetic approach. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999. 464p.
- KAMDEM, J. P.; STEFANELLO, S. T.; BOLIGON, A. A.; WAGNER, C.; KADE, I. J.; PEREIRA, R. P.; PRESTE, A. S.; ROOS, D. H.; WACZUK, E. P.; APPEL, A. S.; ATHAYDE, M. L.; SOUZA, D. O.; ROCHA, J. B. In vitro antioxidant activity of stem bark of *Trichilia catigua* Adr. Juss. **Acta Pharmaceutica**. v. 62, p. 371-382, 2012a.
- KAMDEM, J. P.; WACZUK, E. P.; KADE, I. J.; WAGNER, C.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; SOUZA, D. O.; ROCHA, J. B. T. Catuaba (*Trichilia catigua*) Prevents Against Oxidative Damage Induced by In Vitro Ischemia Reperfusion in Rat Hippocampal Slices. **Neurochemical Research**, v. 37, p. 2826-2835, 2012b.

- KANO, R.; YASUDA, K.; NAKAMURA, Y.; HASEGAWA, A. *Microsporum gypseum* isolated from a feline case of dermatophytosis. **Mycoses**. v. 44, p. 338–341, 2001.
- KANTZ, K., SINGLETON, V. L. Isolation and determination of polymeric polyphenols using Sephadex LH-20 and analysis of grape tissue extracts. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 41, p. 223 – 228, 1990.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2, p. 123–140, 2004.
- KARONEN, M.; LEIKAS, A.; LOPONEN, J.; SINKKONEN, J.; OSSIPOV, V.; PIHLAJA, K., Reversed-phase HPLC-ESI/MS analysis of birch leaf proanthocyanidins after their acidic degradation in the presence of nucleophiles. **Phytochemical Analysis**, v.18(5), p. 378-386, 2007.
- KELMANSON, J. E.; JAGER, A. K.; VAN STADEN, J. Zulu medicinal plants with antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 241–246, 2000.
- KHANDABABAE, K.; VAN REE, T. Tannins: classification and definition. **Natural Product Reports**. v.18, n. 6, p 641-649, 2001.
- KLEIN, R. M. Meliaceas. In: R. Reitz (ed.), *Flora Ilustrada Catarinense – Meliaceas*; Herbário Barbosa Rodrigues: Itajaí, SC, Brasil, 1984. p.55-60.
- KLETTER, C.; GLASL, S.; PRESSER, A.; WERNER, I.; REZNICEK, G.; NARANTUYA, S.; CELLEK, S.; HASLINGER, E.; JURENITSCH, J. Morphological, chemical and functional analysis of catuaba preparations. **Planta Medica**. v. 70 (10), p. 993 -1000, 2004.
- KONATÉ, K.; YOMALAN, K.; SITAR, O.; BRESTIC, M. Antidiarrheal and antimicrobial profiles extracts of the leaves from *Trichilia emetica* Vahl. (Meliaceae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 5(3), p. 242-248, 2015.
- KONEMAN, E.; WINN, W.; ALLEN, S.; PROCOP, G.; SCHEREKBERGER, P.; WOODS, G. *Diagnóstico microbiológico*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 11, parte 1.
- KOUPAI-ABYAZANI, M. R.; MCCALLUM, J.; BOHM, B. A. Identification of the 613 constituent flavanoid units in sainfoin proanthocyanidins by reversed- 614 phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v.117(23), p. 594-615, 1993a.
- KOUPAI-ABYAZANI, M. R.; BOHM, B. A. The condensed tannins of *Leptarrhena pyrofolia*. **Phytochemistry**. v.33, p. 1485-1487, 1993b.
- KRAFT, S.; MACKLER, E.; SCHLICKMAN, P.; WELCH, K.; DePESTEL, D. Outcomes of therapy: vancomycin-resistant enterococcal bacteremia in hematology and bone marrow transplant patients. **Support Care Cancer**. v. 19, p.1969-1974, 2011.
- KVASNICKA, F. Application of CE in hydrodynamically clodes systems for analysis of bioactive compounds in food. **Electrophoresis**. v. 28, p. 3581-3589, 2007.
- LAMBERT, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the Royal Society of Medicine**. v. 95, p. 22-26, 2002.
- LEAVIS, H. L.; WILLEMS, R. J.; TOP, J.; SPALBURG, E.; MASCINI, E. M.; FLUIT, A. C.; HOEPELMAN, A.; DE NEELING, A. J.; BONTEN, M. J. Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. **Emerging Infections Diseases Journal**. v. 9, p. 1108-1115, 2003.

- LECHTENBERG, M.; QUANDT, B.; NAHRSTEDT, A. Quantitative determination of cucuminoids in *Curcuma* rhizomes and rapide differentiation of *Curcuma domestica* Val. and *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. by capillary electrophoresis. **Phytochemical analysis**. v.15, p. 152-158, 2004.
- LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Rationale for combination antifungal therapy **Pharmacotherapy**. v. 21, p.149–164, 2001.
- LI, Z.; HUANG, D.; TANG, Z.; DENG, C. Microwave-assisted extraction followed by CE for determination of catechin and epicatechin in green tea. **Journal of Separation Science, Weinheim**, v. 33, p. 1079-1084, 2010.
- LINHARDT, R. J.; TOIDA, T. Ultra-High Resolution Separation Comes of Age. **Science**. v. 298, p. 1441-1442, 2002.
- LIU, E. H.; QI, L. W.; CAO, J.; LI, C. Y.; PENG, Y. B. Advances of modern chromatographic and electrophoretic methods in separation and analysis of flavonoids. **Molecules**. v.13, p. 2521-2544, 2008.
- LIU, A.; TRAN, L.; BECKET, E.; LEE, K.; CHINN, L.; PARK, E.; TRAN, K.; MILLER, J. H. Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: Generating an antibiotic bar code. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 54, p. 1393–1403, 2010.
- LONGHINI, R.; KLEIN, T.; BRUSCHI, M. L.; SILVA JUNIOR, W. V.; RODRIGUES, J.; LOPES, N. P.; MELLO, J. C. P. Development and validation studies for determination of phenylpropanoid substituted flavan-3-ols in semipurified extract of *Trichilia catigua* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Journal of Separation Science**, v.36, p.1247-1254, 2013.
- LONNI, A. A. S. G.; LONGHINI, R.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. **Analytica Chimica Acta**, v. 719, p. 57-60, 2012.
- LUNTE, S. M.; MARTIN, R. S.; LUNTE, C. E. Capillary Electrophoresis/Electrochemistry. In: BRAJTER-TOTH, A.; CHAMBERS, J. Q. (Ed.). **Electroanalytical Methods for Biological Materials**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002. p. 461-490.
- LUPETTI, A.; TAVANTI, A.; DAVINI, P. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiol.** v. 40, p. 2363–2369, 2002.
- MALFERTHEINER, P. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. European *Helicobacter Pylori* Study Group. **Gut**. v. 41, p. 8-13, 1997.
- MATOS, A. P. Busca de compostos inseticidas: estuda da espécies do gênero *Trichilia* (Meliaceae). 2006. 194f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Programa de Pós Graduação em Química, Universidade de São Carlos, São Carlos.
- MATOS, A. P.; NEBO, L.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua*. **Quimica Nova**, v. 32(6), p.1553-1556, 2009.

- MAVE, V.; GARCIA-DIAZ, J.; ISLAM, T.; HASBUN, R. Vancomycin resistant enterococcal bacteraemia: is daptomycin as effective as linezolid? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 64, p. 175–180, 2009.
- McKINNELL, J. A.; PATEL, M.; SHIRLEY, R. M.; KUNZ, D. F.; MOSER, S. A.; BADDLEY, J. W. Observational study of the epidemiology and outcomes of vancomycin- resistant *Enterococcus* bacteraemia treated with newer antimicrobial agents. **Epidemiology & Infectology**. v. 139, p.1342-1350, 2011.
- MÉAN, M.; MARCHETTI, O.; CALANDRA, T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. **Critical Care**. v.12, 2008.
- MÉGRAUD, F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. **Gut**. v. 53(9), p.1374–1384, 2004.
- MELLO, J. C. P.; ITO, L. A. Aplicação da eletroforese capilar na análise de produtos naturais. In: SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. (Org.). *Revisões em processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de ativos de plantas medicinais*. Ouro Preto: Editora UFOP, 2011. p. 209-242.
- MELO, J. G.; MARTINS, J. D. G. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Botânica Brasileira**. v. 21, p. 27-36, 2007.
- MICELI, M. H.; LEE, S. A. Emerging moulds: epidemiological trends and antifungal resistance. **Mycoses**. v. 54, p. 666-678, 2011.
- MIRANDA, L. N.; VANDERHEIJDEN, I. M.; COSTA, S. F.; SOUSA, A. P.; SIENRA, R. A.; GOBARA, S.; SANTOS, C. R.; LOBO, R. D.; PESSOA, V. P.; LEVIN, A. S. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. **Journal of Hospital Intection**. v. 72, p. 9–16, 2009.
- MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; GHANNOUM, M. A. **Combination** treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Review**. v.18, p.163–194, 2005.
- MURDOCH, D. R.; MIRRETT, S.; HARRELL, L. J.; MONAHAN, J. S.; RELLER, L. B. Sequential emergence of antibiotic resistance in enterococcal bloodstream isolates over 25 years. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 46, p.3676-3678, 2002.
- MURRAY, B. E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. **The New England Journal of Medicine**. v.342, p.710-721, 2000.
- MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A.; KOBAYASHI, G.S. **Microbiologia Médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 604p.
- NACZK, M.; SHAHIFI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**. v. 1054, p. 95-111, 2004.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**. v.11, p.142–201, 1998.
- NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; SVIDZINSKI, T.; OLIVEIRA, R. *Candida tropicalis* biofilms: artificial urine, urinary catheters and flow model. **Medical Micology**. v. 49, p. 739–47, 2011.

- NEWMAN, R. H.; PORTER, L. J. Solis state ^{13}C -NMR studies on condensed tannins. In: HEMINGWAY, R. W.; LANKS, P. E. *Plant polyphenols*. Plenum Press, New York, 1992. p.339-347.
- NGUYEN, N. H.; SUH, S. O; BLACKWELL, M. Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from *Neuroptera* and other insects. **Mycologia**. v. 99, p. 842-858, 2007.
- NIEDERMAN, M. S. Appropriate use of antimicrobial agents: Challenges and strategies for improvement. **Critical Care Medicine**. v. 31, p. 608–616, 2003.
- NOSTRO, A.; GERMANO, M. P.; D'ANGELO, V.; MARINO, A.; CANNATELLI, M. A. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**. v. 30, p. 379–384, 2000.
- NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Disease**. v. 51, p. 561-570, 2010.
- OKSUZ, S.; SAHIN, I.; YILDIRIM, M.; GULCAN, A.; YAVUZ, T.; KAYA, D.; KOC, A. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. **Japanese journal of infectious diseases**. v. 60 (5), p. 280–283, 2007.
- OLIVEIRA, C. H., MORAES, M. E., MORAES, M. O., BEZERRA, F. A., ABIB, E., DE NUCCI, G. Clinical toxicology study of an herbal medicinal extract of *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber officinale* (Catuama) in healthy volunteers. **Phytotherapy Research**. v. 19, p. 54–57, 2005.
- OLIVEIRA, M. L. M. Efeitos do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham.e do óleo fixo de *Caryocar coreacium* Wittm. Sobre a inflamação tópica e a cicatrização de feridas cutâneas. Dissertação de Mestrado. Fortaleza.Universidade federal do Ceará, 2004. 113p.
- OLIVEIRA, K. P.; SOFIAT F. T; MOURÃO, K. S. M.; MARQUES, L. C. Análise farmacognóstica comparativa de dois lotes de cascas de *Trichilia catigua* Adr. Juss. (meliaceae), a catuaba da Bahia. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v. 3 (1), p. 2-8, 2011.
- ORTEGA, M.; MARCO, F.; SORIANO, A.; ALMELA, M.; MARTÍNEZ, J. A.; LÓPEZ, J., PITART, C.; MENSA, J. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. **Journal of Hospital Infection**. v. 77 (2), p. 157-161, 2011.
- PALMER, K. L.; GILMORE, M. S. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. **MBio**, v. 1 (4), 2010.
- PAMMI, M.; HOLLAND, L.; BUTLER, G.; GACSER, A.; BLISS, J. M.. *Candida parapsilosis* Is a Significant Neonatal Pathogen: A Systematic Review and Meta-analysis. **Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 32, p. 206-216, 2013.
- PASTENE E.; SPEISKY H.; TRONCOSO M.; ALARCÓN J.; FIGUEROA G. *In vitro* inhibitory effect of apple peel extract on the growth of *Helicobacter pylori* and respiratory burst induced on human neutrophils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57 (17), p. 7743-7749, 2009a.

- PASTENE E.; TRONCOSO M.; FIGUEROA G.; ALARCÓN J.; SPEISKY H. Association between polymerization degree of apple peel polyphenols and inhibition of *Helicobacter pylori* urease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57 (2), p. 416-424, 2009b.
- PASTENE, E. Actividad de extractos ricos en polifenoles de cáscara de manzana sobre *Helicobacter pylori*: estudios *in vitro* e *in vivo*. 2010. 180 f. Tese (Doutorado). Universidade do Chile, Chile, 2010a.
- PASTENE, E.; SPEISKY, H.; GARCÍA, A.; MORENO, J.; TRONCOSO, M.; FIGUEROA G. In vitro and in vivo effects of apple peel polyphenols against *Helicobacter pylori*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, p.7172-7179, 2010b.
- PATRÍCIO P. C.; CERVI, A. C. O Gênero *Trichilia* P. Browne (Meliaceae) no estado do Paraná, Brasil. **Acta Biologica Paranaense**. v.34, p. 27-71, 2005.
- PAHWA, N.; KUMAR, R.; NIRKHIWALE, S.; BANDI, A. Species distribution and drug susceptibility of *Candida* in clinical isolates from a tertiary care centre at Indore. **Indian Journal of Medical Microbiology**. v.32 (1), p.44–48, 2014.
- PENNINGTON, T. D.; STYLES, B. D.; TAYLOR, D. A. H. Meliaceae. **Flora Neotropical Monograph**. v. 28, p. 235-244, 1981.
- PERES, R. G.; MICKE, G. A.; TAVARES, M. F. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Multivariant optimization, validation and application of capillary electrophoresis for simultaneous determination of polyphenols and phenolic acids in Brazilian wines. **Journal of Separation Science, Weinheim**, v. 32, p. 3822-3828, 2009.
- PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B.. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Medical Mycology**. v.45, p.321-346, 2007.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Critical Reviews in Microbiology**. v.36, p.1-53, 2010.
- PIGGOT, P. J.; HILBERT, D. W. Sporulation of *Bacillus subtilis*. **Current Opinion in Microbiology**. v.7, p. 579–586, 2004.
- PIZZOLATTI, M. G.; KOGA, A. H; GRISAR, E. C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. **Phytomedicine**. v.9, p. 422-426, 2002a.
- PIZZOLATTI, M. G.; VENSON, A. F.; SMÂNIA, A. J.; SMÂNIA, E. F. A.; BRAZ-FILHO, R. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. **Zeitschrift der Naturforschung**. v. 57, p. 483–488, 2002b.
- PIZZOLATTI, M. G.; VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M.; MADUREIRA, L. A.; BRAZ FILHO, R. Minor gamma-lactones from *Trichilia catigua* (Meliaceae) and its precursors by GC-MS. **Natural Product Research**. v. 18 (5), p. 433- 438, 2004.
- PREINERSTORFER, B.; LAMMERHOFER, M.; LINDNER, W. Avances in enantioselective separations using electromigration capillary techniques. **Electrophoresis**. v.30, p.100-132, 2009.
- PROENÇA DA CUNHA, A.; SILVA, A.; ROQUE, O. Marmeleiro. In: Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, 2003.

- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, p. 3396-3402, 2000.
- QA'DAN, F.; VERSPOHL, E. J.; NAHRSTED, A.; PETEREIT, G.; MATAŁKA, K. Z. Cinchonina 1b isolated from *Eriobotrya japonica* induces insulin secretion in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**. v.124 (2), p. 224-227, 2009.
- QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, LEMOS, S. A.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**. v. 26 (4), p. 493-497, 2002.
- QUINTÃO, N. L. M.; FERREIRA, J.; BEIRITH, A.; CAMPOS M. M., CALIXTO, J. B. Evaluation of the effects of the herbal product Catuamas in inflammatory and neuropathic models of nociception in rats. **Phytomedicine**. v.15, p. 245–252, 2008.
- RABELO, D. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Quantificação de fenóis totais presentes nas cascas de *Trichillia catigua* A. Juss. (Meliaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.15 (2), p. 230-236, 2013.
- RESENDE, F. O.; RODRIGUES-FILHO, E.; LUFTMANN, H.; PETEREIT, F.; MELLO, J. C. P. Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols from *Trichillia catigua* and their in vitro antioxidative activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 22, p. 2087-2093, 2011.
- RESENDE, F. O. *Trichillia catigua*: avaliação farmacognóstica, fitoquímica e biológica in vitro. 2007. 167 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Maringá, 2007.
- RICHARDSON, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, p. 5-11, 2005.
- RIGAUD, J., ESCRIBANO-BAILON, M. T.; PRIEUR, C.; SOUQUET, J. M.; CHEYNIER, V. Normal-phase high-performance separation of procyanidins from grape seeds. *Journal of Chromatography A*. v. 654, p. 255-260, 1993.
- RIGHETTI, P. G.; HANCOCK, W. Ed.; *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*; CRC Press, 1995.
- RODRIGUES, C. M. Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais. 2007. 1ppf. Tese (doutorado) Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química. Araraquara.
- RODWELL, G. E.; BAYLES, C. L.; TOWERSEY, L.; ALY, R. The prevalence of dermatophyte infection in patients infected with human immunodeficiency virus. **Internal Journal of Dermatology**. v. 47, p. 339-43, 2008.
- ROLIM, A.; MACIEL, C. P.; KANEKO, T. M.; CONSIGLIERI, V. O.; SALGADO-SANTOS, I. M.; VELASCO, M. V. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichillia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) commercial extract. **Journal AOAC International**. v. 88 (4), p.1015-1019, 2005.
- ROMANO, C.; GHILARDI, A.; PAPINI, M. Nine male cases of tinea genitalis. **Mycoses**. v.48, p.202–204, 2005.
- ROTA, J. F. Frequência de espécies de *Candida* no Hospital Universitário de Londrina. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia), Londrina – PR, 2009, 95p.

- RUIZ-SANCHEZ, D.; CALDERON-ROMERO, L.; SANCHEZ-VEJA, J.T; TAY, J.. Intestinal candidiasis: A clinical report and comments about this opportunistic pathology. **Mycopathologia**. v.156, p.9–11, 2002.
- SAAD, A.; FADLI, M.; BOUAZIZ, M.; BENHARREF, A.; MEZRIOUI, N. E.; HASSANI, L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. **Phytomedicine**. v.17(13), p.1057-1060, 2010.
- SAIMAN, L.; LUDINGTON, E.; DAWSON, J. D. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. **Pediatric Infectious Disease Journal**. v.20, p.1119–1124, 2001.
- SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P.. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRS/UFSC, 2004.
- SANTOS, A. H.; RAMOS, A. C.; SILVEIRA, K. M.; KISS, A. C. I.; LONGHINI, R.; DINIZ, A.; MELLO, J. C. P.; GERDARDIN, D. C. C. The exposure to *Trichilia catigua* (catuaba) crude extract impairs fertility of adult female rats but does not cause reproductive damage to male offspring. **Journal of Ethnopharmacology**. v.166, p. 86-91, 2015.
- SARANRAJ, P.; SIVASAKTHI, S. Medicinal plants and its antimicrobial properties: a review. **Global Journal of Pharmacology**. v. 8(3), p. 316–3278, 2014.
- SATOH, M.; SATOH, Y.; FUJIMOTO, Y. Cytotoxic Constituents from *Erythroxylum catuaba* Isolation and Cytotoxic Activities of Cinchonais. **Natural Medicine**. v. 54 (2), p. 97-100, 2000.
- SARTORI, M. R. K. Atividade antimicrobiana de frações de extratos de compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* SPRENG (*Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE). Dissertação de Mestrado. Santa Catarina. Universidade do Vale do Itajaí. 2005, 81p.
- SCALBERT A.; WILLIANSON G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**. v.130 (8), p. 2073-2085, 2000.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N.. Analysis of condensed tannis: a review. **Animal Feed Science and Technology**. v. 91, p. 21-40, 2001.
- SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**. v.166, p.335-52, 2008.
- SENA, L. B.; OLIVEIRA, D. C.; PAULA, C. D. R.; COSTA, M. C.; FRANCESCHI, L. E. A. P.; COSTA, I. M. C. *Trichophyton rubrum* dermatophytosis in a patient under chronic use of systemic corticoids: an exuberant presentation. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90(4), p.598-9, 2015.
- SEREIA, A. L. Desenvolvimento de metodologia analítica por eletroforese capilar para polifenóis da fração semipurificada de *Trichila catigua* A. Juss (Meliaceae). 2013. 97f. Dissertação [Mestrado em ciências farmacêuticas] Universidade Estadual de Maringá, 2013.
- SHAO, L. C.; SHENG, C. Q.; ZHANG, W. N. Recent advances in the study of antifungal lead compounds with new chemical scaffolds. **Yao Xue Xue Bao**. v. 42, p. 1129–1136, 2007.
- SILVA, M. S. Uso e Avaliação Farmacológica de Plantas Medicinais Utilizadas na Medicina Popular do Povoado Colônia Treze em Lagarto/SE. **Anais do II Encontro da Agência Nacional de Pós Graduação e Pesquisa em Ambiente e Sociedade – ANPPAS/2004**. Disponível em:

- http://www.anppas.org.br/encontro_anual/encontro2/GT/GT02/GTMariaSilene.pdf Acesso em 09/2014.
- SILVA, J. A.; COLTRO, W. K. T.; CARRILO, E.; TAVARES, M.F.M.; Terminologia para as técnicas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, p. 740-744, 2007.
- SILVA, F. M. A.; FOWLER, H. G.; LEMOS, R. N. S. Parasitismo em lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith), na região do Triângulo Mineiro, MG. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, p.235-241, 1997.
- SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 36, p. 288–305, 2011.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidants. **Revista de Nutrição**, v.15, 71-77p. 2002
- SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**. v. 369, p. 1961-1971, 2007.
- SOUSA, C. M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA-JR, G. M., AYRES, M. C. C; COSTA, C. L. S.; ARAUJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAUJO, P. B. M.; BRANSÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. v. 30, p. 351-355, 2007.
- SPRINGFIELD, E. P.; EAGLES, P. K. F.; SCOTT, G. Quality assessment of South African herbal medicines by means of HPLC fingerprinting. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 101, p. 75-83, 2005.
- STREIT, J. M.; JONES, R. N.; SADER, H. S.; FRITSCH, T. R. Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001). **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 24, p. 111-118, 2004.
- SUNTORNUSUK, L. Capillary electrophoresis of phytochemical substances. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 27, p. 679-698, 2002.
- SUNTORNUSUK, L. Recent advances of capillary electrophoresis in Pharmaceutical analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 29-52, 2010.
- TAGLIARO, F.; MANETTO, G.; CRIVELLENTI, F.; SMITH, F. P. A brief introduction to capillary electrophoresis. **Forensic Science International**. v. 92, p. 75-88, 1998.
- TAKAHASHI, J.; KOMATSUZAWA, H.; YAMADA, S.; NISHIDA, T.; LABISCHINSKI, H.; FUJIWARA, T.; OHARA, M.; YAMAGISHI, J.; SUGAI, M. Molecular characterization of an *atl* null mutant of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Immunology**. v. 46, p. 601-612, 2002.
- TAM, V. H.; CHANG, K. T.; ABDELRAOUF, K.; BRIOSO, C. G.; AMEKA, M.; MCCASKEY, L. A.; WESTON, J. S.; CAEIRO, J. P.; GAREY, K. W. Prevalence, resistance mechanisms, and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 54, p. 1160-1164, 2010.
- TANG, W.; HIOKI, H.; HARADA, K.; KUBO, M.; FUKUYAMA, Y. Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. **Journal of Natural Products**. v. 70, p. 2010–2013, 2007.
- TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**. v. 19, p.173-181, 1996.

- TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Quimica Nova**, v. 20, p. 493-511, 1997.
- TEIXEIRA, L. M.; MERQUIOR, V. L. C. Enterococcus *in*: Molecular typing in bacterial infections, infectious disease, 2013 p.17-26.
- TIMMERS, G. J.; VAN DER ZWET, W. C.; SIMOONS-SMIT, I. M.; SAVELKOUL, P. H.; MEESTER, H. H.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; HUIJGENS, D. P. C. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a haematology unit: risk factor assessment and successful control of the epidemic. **British Journal of Haematology**. v.116, p. 826-833, 2002.
- THE PLANT LIST 2012 - disponível em: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Meliaceae/e> <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=trichilia+catigua> acesso em 20/12/2015.
- THE NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE 2005. *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. Web. 1 Dec 2015. Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/index.html.
- TOLEDO, C. E. M. Estudos anatômico, químico e biológico das cascas de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Covile, Leguminosae. 2002. 92f. Dissertação (Mestrado), Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara, 2002.
- TORTORANO, A. M.; KIBBLER, C.; PEMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; GRILLOT, R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 27, p. 359-366, 2006.
- TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. *Microbiologia. Staphylococcus aureus*. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 20, p. 175-182.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.
- TSAI, P. W. A.; CHEN, Y. T. A.; HSU, P. C. A.; LAN, C. Y.. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. **BioMedicine**. v. 3, p. 51-64, 2013.
- UBEDA, C.; TAUR, Y.; JENQ, R. R.; EQUINDA, M. J.; SON, T.; SAMSTEIN, M.; VIALE A.; SOCCI, N. D.; VAN DEN BRINK, M. R.; KAMBOJ, M.; PAMER, E. G. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. **Journal of Clinical Investigation**. v. 120, p. 4332-4341, 2010.
- VALLSTRÖM, A. *Helicobacter pylori*: molecular mechanisms for variable adherence properties. 2009. 57f. Dissertação (Mestrado), Universidade Umeå, Suécia, 2009.
- VASCONCELOS, M. C. C.; SAMPAIO, F. C.; SAMPAIO, J. S. Higinio Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. **Mycoses**. v. 46, p.192–196, 2003.
- VAZ R. V.; MATA L. V.; CALIXTO J. B. Analgesic effect of the herbal medicine Catuama in thermal and chemical models of nociception in mice. **Phytotherapy Reserarch**. v.11, p.101–106, 1997.
- VEIGA-JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 464-471, 2008.
- VENA, G. A.; CHIECO, P.; POSA, F.; GAROFALO, A.; BOSCO, A.; CASSANO, N. Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. **New Microbiology**. v. 35, p. 207-213, 2012.

- VERDI, L. G., BRIGHENTE, I. M. C., PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, p. 85-94, 2005.
- VIANA, A. F.; MACIEL, I. S.; MOTTA, E. M.; LEAL, P. C.; PIANOWSKI L.; CAMPOS M. M.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive activity of *Trichilia catigua* hydroalcoholic extract: new evidence on its dopaminergic effects. **Evidence based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2011, 2009.
- WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. 2ª edição. New York: Wiley-VCH, 2000. 209p.
- WANG, L.; ROTHMUND, D.; CURD, H.; REEVES, P. R. Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. **Journal of Bacteriology**. v.185, p. 2936–2943, 2003.
- WANG, L.; CHI, Z.; YUE, L.; ZHANG, D. Occurrence and diversity of *Candida* genus in marine environments. **Journal of Ocean University of China**, v. 7, p. 416-420, 2008.
- WEINBERGER, R. **Practical Capillary Electrophoresis**. San Diego: Academic Press, Inc.,1993. 312p.
- WERTHEIM, H. F.; MELLES, D. C.; VOS, M. C.; VAN LEEUWEN, W.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. A.; NOUWEN, J. L. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **Lancet Infectious Diseases**. v. 5, p. 751–762, 2005.
- WHITE, T. C.; OLIVER, B. G.; GRASER, Y.; HENN, M. R. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. **Eukaryotic Cell**. v. 7, p. 1238-1245, 2008.
- WILLEMS, R. J.; TOP, J.; VAN SANTEN, M.; ROBINSON, D. A.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; GRUNDMANN, H.; BONTEN, M. J. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, p. 821–828, 2005.
- WIND, M.; HOFFMANN, P.; WAGNER, H.; THORMANN, W. Chiral capillary electrophoresis as predictor for separation of drug enantiomers in continuous flow zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**. v. 895, p. 51-65, 2000.
- YANG, Y. L.; HO, Y. A.; CHENG, H. H.; HO, M.; LO, H. J. Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 25 (1), p. 60–64, 2004.
- YANAGIDA, A.; SHOJI, T.; SHIBUSAWA, Y. Separation of proanthocyanidins by degree of polymerization by means of size-exclusion chromatography and related techniques. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. v. 56, p. 311 – 322, 2003.
- YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; Cechinel Filho, V. Farmacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofarmacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24 (1), p.147-152, 2001.
- ZHANG, Q.; QIN, L.; WANG, J.; LI, L. Report of two cases of tinea infection with scutula-like lesions caused by *Microsporum gypseum*. **Internal Journal of Dermatology**. v. 41, p. 372–373, 2002.
- ZONGO, C.; SAVADOGO, A.; OUATTARA, L.; BASSOLE, I. H. N.; OUATTARA, C. A. T.; OUATTARA, A. S.; BARRO, N.; KOUDOU, J.; TRAORE, A. S. Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of *Ampelocissus grantii* (Baker) Planch. (Vitaceae): a medicinal plant from Burkina Faso. **International Journal of Pharmacology**. v. 6, p. 880–887, 2010.

APÊNDICE A – MICROSCOPIA DE EFRV

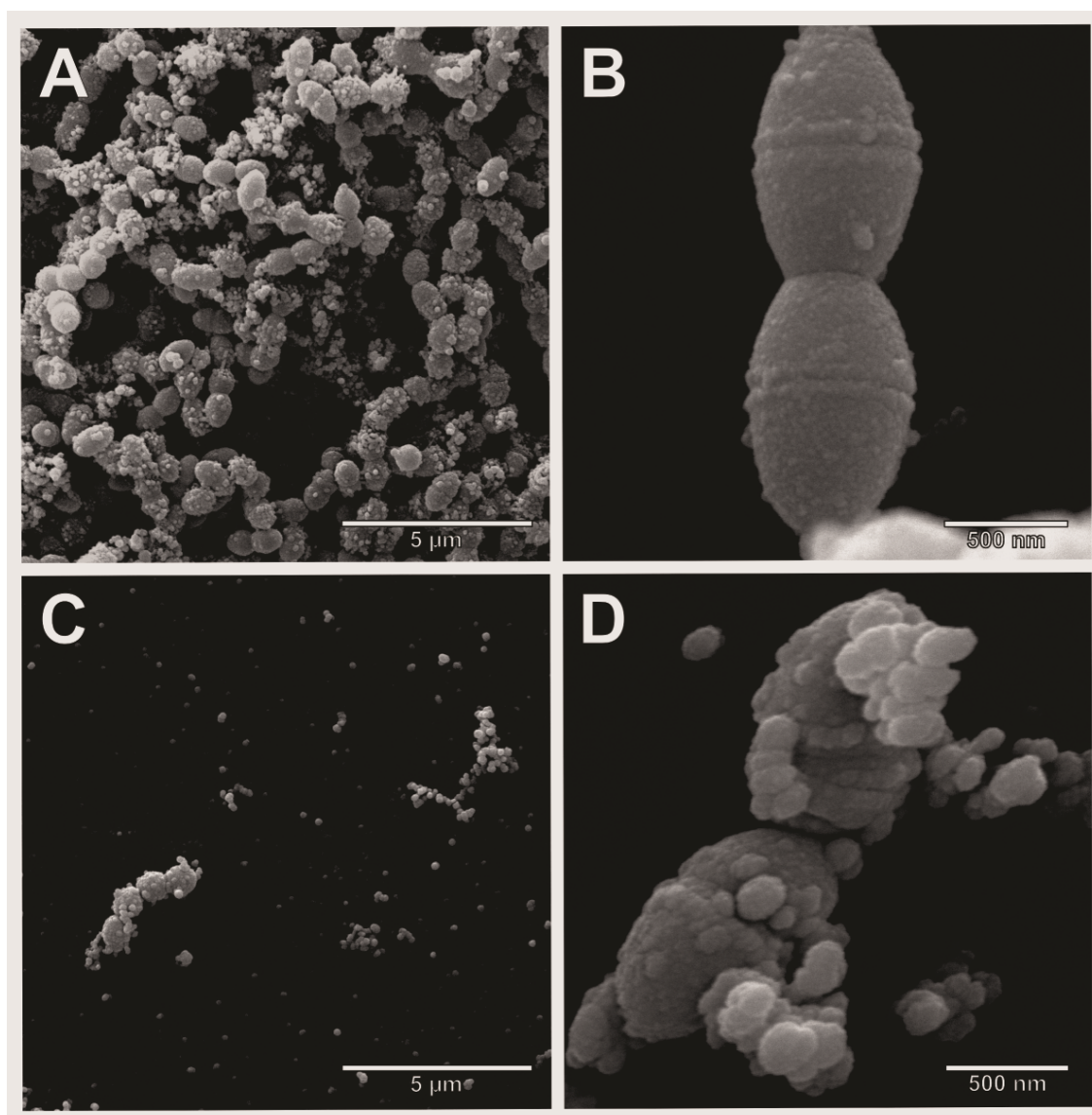


Figura A: Microscopia eletrônica de varredura da atividade antimicrobiana da FAE de *T. catigua* contra EFRV isolado clínico 170: (A) e (B) controle negativo; (C) e (D) células tratadas com 156 µg/ml de FAE. (A) e (C) aumento de 20000 x; (B) e (D) 80000 x. Onde pode ser observada a diminuição no número de células, fragmentos sugestivos de lise e estruturas indicativas de vesículas apoptóticas. As amostras foram cultivadas nas condições controle e tratamento, com densidade celular ajustada para 10^8 UFC/ml e incubadas a 37°C por 3 h. As lâminas foram preparadas com 10 µl da solução celular e 10 µl de fixador (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M pH 7,2), então adicionadas em lâmina de vidro revestida com poli-L-lisina. Depois de 30 min foi adicionado 500 µl de fixador sobre as lâminas por 4 h, seguido de pós fixação em OsO_4 1% por 1 h. As amostras foram secas em gradiente de etanol e ponto crítico com CO_2 (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer), então cobertas com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e observadas em microscopia (FEI Quanta 200).