

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BRUNO BORGES RAMOS

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS HEXÂNICO E METANÓLICO DAS FOLHAS DE
Campomanesia sessiliflora: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PERFIL
ANTIMICROBIANO**

PATOS DE MINAS

JULHO DE 2017

BRUNO BORGES RAMOS

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS HEXÂNICO E METANÓLICO DAS FOLHAS DE
Campomanesia sessiliflora: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PERFIL
ANTIMICROBIANO**

Monografia apresentada ao Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Ribas Fürstenau

PATOS DE MINAS

JULHO DE 2017

BRUNO BORGES RAMOS**Obtenção de extratos hexânico e metanólico das folhas de *Campomanesia sessiliflora*:
caracterização físico-química e perfil antimicrobiano**

Monografia apresentada ao Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Ribas Fürstenau

Banca examinadora:

Profa. Dra. Cristina Ribas Fürstenau
INGEB – UFU –Presidente

Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas
INGEB – UFU – Membro

Profa. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira
INGEB – UFU –Membro

Patos de Minas-MG, 14 de julho de 2017.

RESUMO

O Cerrado abrange uma extensa área natural do território brasileiro e possui uma grande variedade de plantas nativas. Essas plantas retêm compostos de grande potencial biológico, como os flavonoides e taninos, sendo conhecidas como plantas medicinais. A *Campomanesia sessiliflora*, popularmente conhecida como guabiroba-verde, pertence à família Myrtaceae, e se inclui entre as plantas medicinais do Cerrado. O presente estudo teve por objetivo a obtenção de extratos hexânico e metanólico de *C. sessiliflora*, bem como a determinação de propriedades físico-químicas e antimicrobiana da mesma. Os extratos hexânico e metanólico foram obtidos das folhas de *C. sessiliflora* por meio de extração exaustiva em hexano ou metanol como solventes, respectivamente. O conteúdo de fenólicos totais de ambos os extratos foi determinado utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. O pH dos extratos hexânico e metanólico foi determinado por medida direta em pHmetro. A potencial atividade antimicrobiana dos extratos hexânico e metanólico da planta foi investigada a partir do método de difusão em ágar contra três cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. O rendimento dos extratos hexânico e metanólico das folhas de *C. sessiliflora* foi de 7,28% e 33,20%, respectivamente. O pH dos extratos foi $5,05 \pm 0,04$ para o hexânico e de $4,026 \pm 0,005$ para o metanólico. O conteúdo de fenólicos totais foi de 170 e 128,818 mg Eq AG/ g de extrato para os extratos hexânico e metanólico, respectivamente. Com relação ao potencial antimicrobiano, o extrato metanólico obtido das folhas de *C. sessiliflora* foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* de maneira concentração dependente. Em conjunto, os dados desse estudo demonstram que os extratos das folhas de *C. sessiliflora* possuem uma grande quantidade de compostos fenólicos totais, possivelmente flavonoides, que são moléculas responsáveis por exibirem atividades antitumorais, anti-inflamatória e antimicrobiana, essa última comprovada no ensaio de difusão em ágar, corroborando o grande potencial farmacológico e medicinal da planta.

Palavras chave: *Campomanesia sessiliflora*. Guabiroba-verde. Extrato hexânico. Extrato metanólico. Compostos fenólicos. *S. aureus*.

ABSTRACT

Cerrado comprises a huge natural area of Brazilian territory and it has a wide diversity of native plant species. These plants retain compounds of high biological potential, such as flavonoids and tannins, being well known as medicinal plants. Campomanesia sessiliflora is popularly known as “guabiroba-verde”. It belongs to Myrtaceae family and is included in the group of medicinal plants of Cerrado. This study aimed to obtain hexanic and methanolic extracts from C. sessiliflora, as well as to determine its physico-chemical properties and antimicrobial activity. The hexanic and methanolic extracts were obtained from C. sessiliflora leaves through exhaustive extraction in hexane or methanol as solvents, respectively. Total phenolic content of both extracts was evaluated by Folin-Ciocalteu reagent. The pH of hexanic and methanolic extracts was determined by direct measurement in pH meter. Potential antimicrobial activity of hexanic and methanolic extracts from the plant was investigated by agar diffusion method against three bacterial strains: Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli. The yield of the hexanic and methanolic leaves extract was 7,28% and 33,20%, respectively. The extracts pH was $5,05 \pm 0,04$ for hexanic and $4,026 \pm 0,005$ for methanolic. Total phenolic content was 170 and 128,818 mg EqAG/ g of hexanic and methanolic extract, respectively. Regarding antimicrobial activity, methanolic extract from C. sessiliflora leaves could inhibit S. aureus growth in a concentration-dependent manner. Taken together, these data demonstrate that extracts from C. sessiliflora leaves have a large amount of total phenolic compounds, possibly flavonoids, which are molecules responsible for antitumoral, anti-inflammatory and antimicrobial activities; this last was confirmed in agar diffusion test, corroborating the high pharmacological and medicinal potential of the plant.

Key-words: *Campomanesia sessiliflora*. Guabiroba-verde. Hexanic extract. Methanolic Extract. Phenolic compounds. *S. aureus*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL : microlitros

AMC: Amoxicilina Clavulanato

ATCC: do inglês “*American Type Culture Collection*”

ATM: Aztreonam

DMSO: Dimetil Sulfóxido

E. coli: *Escherichia coli*

mg: miligramas

mL: mililitros

mm: milímetros

Na_2CO_3 : carbonato de sódio

OMS: Organização Mundial da Saúde

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

pH: potencial hidrogeniônico

rpm: rotações por minuto

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	2
3 OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo Geral	4
3.2 Objetivos específicos	4
4 MATERIAL E MÉTODOS	5
4.1 Material vegetal	5
4.2 Obtenção dos extratos hexânico e metanólico das folhas de <i>Campomanesia sessiliflora</i>	5
4.3 Avaliação do pH dos extratos hexânico e metanólico de <i>Campomanesia sessiliflora</i>	5
4.4 Quantificação do conteúdo de fenólicos totais nos extratos hexânico e metanólico de <i>Campomanesia sessiliflora</i>	6
4.5 Linhagens bacterianas e teste do potencial antimicrobiano dos extratos hexânico e metanólico das folhas de <i>Campomanesia sessiliflora</i>	7
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
6 CONCLUSÃO	14
REFERÊNCIAS	16

1 INTRODUÇÃO

Desde os antepassados, as plantas medicinais vêm contribuindo significativamente para o tratamento e cura de muitas doenças. Este hábito foi verificado por seres humanos que, na antiguidade, percebiam que animais doentes, quando faziam a ingestão de certos vegetais, ficavam visualmente melhores. Tal procedimento passou, então, a ser testado pelos humanos. Com o passar dos anos, esse conhecimento foi herdado e atualmente faz-se o uso das plantas medicinais em grande escala. Devido à grande biodiversidade brasileira, o Brasil desponta na produção de medicamentos conhecidos como fitoterápicos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os fitoterápicos são substâncias encontradas na planta, ou em parte dela, que são extraídos por procedimentos padronizados e, então, comercializados (JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

O Cerrado é a segunda maior formação vegetal da América do Sul, sendo a savana mais rica em biodiversidade em todo o mundo. É sabido que entre o grande número de espécies conhecidas das plantas do Cerrado, algumas exibem grandes potenciais biológicos. Em vistas do aquecimento global, destaca-se que o típico clima seco e quente dessa formação biológica, eleva as plantas nativas do Cerrado a um alto grau de importância para a sobrevivência de muitas espécies, devido à sua resistência à altas temperaturas (LIMA, 2012). Nesse sentido, observa-se um crescente interesse dos cientistas em explorar as espécies vegetais provenientes dessas localidades, com potencial aplicação em novos medicamentos, cosméticos, indústria alimentícia, indústria têxtil e outras.

Entre as diversas variedades de plantas presentes no Cerrado brasileiro, destaca-se o gênero *Campomanesia*, pertencente à família Myrtaceae. No Brasil, eram relatadas mais de 80 espécies constituintes de tal gênero, as quais que passaram por uma profunda revisão nos últimos anos, reconhecendo-se, atualmente, cerca de 38 espécies. A *Campomanesia sessiliflora*, popularmente conhecida e denominada de guabiroba-verde, é encontrada com frequência no cerrado brasileiro (KATAOKA; CARDOSO, 2013). Tendo em vista os grandes benefícios da *C. sessiliflora*, ao homem, tais como atividade antioxidante, anti-nociceptiva, antiinflamatória, antimicrobiana e fotoprotetora (BARBOSA, 2015, KATAOKA; CARDOSO, 2013), associado ao seu alto potencial biológico e à carência de bases científicas para o seu uso pela população, essa planta foi escolhida para caracterização físico-química e microbiológica no presente estudo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O Cerrado, um dos maiores biomas com maior biodiversidade do mundo, compreende cerca de 2 milhões de Km², abrangendo mais de 2% do território brasileiro, além de países como Bolívia e Paraguai. Existem cerca de 10 mil espécies de plantas no Cerrado, sendo cerca de 5 mil endêmicas. Além disso, possui paisagens que são definidas por serem um mosaico de beleza incomparável (LIMA, 2012). Apesar de seu enorme valor para a humanidade, o Cerrado é um bioma ameaçado, que vem sendo desmatado com a ajuda de propriedades agrícolas e pecuárias aliadas à expansão urbana, resultando na metade da cobertura vegetal que um dia já teve. Embora possua 204 milhões de hectares, apenas 2,2 % dessa área se encontra legalmente protegida (LIMA, 2012).

O Cerrado brasileiro possui uma vasta gama de plantas nativas com alto valor biológico, conhecidas como “plantas medicinais”. As plantas medicinais são aquelas que contêm substâncias químicas que se formam a partir de nutrientes, água e luz, os quais contribuem de forma relevante para a riqueza terapêutica dos vegetais (KLINK; MACHADO, 2005). Essas plantas são, muitas vezes, o único recurso terapêutico de diferentes grupos étnicos e comunidades. O uso desses recursos é tão antigo que pode ser comparado à idade da espécie humana, para a cura de muitas enfermidades. Ainda nos dias de hoje, as plantas medicinais são encontradas nas regiões periféricas, nas grandes cidades e, até mesmo, nos quintais de muitas residências do nosso país, sendo comercializadas e cada vez mais consumidas pela população brasileira devido ao seu potencial historicamente conhecido. São de extrema importância na farmacologia, na cosmetologia e, também, não menos importante, na medicina, área em que são conhecidos como fitoterápicos (MACIEL; PINTO; JÚNIOR, 2002).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde, fitoterápico é o “medicamento farmacêutico obtido por processos tecnologicamente adequados, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais, com finalidades profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que em sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais”. Ainda, denota fitofármaco como “uma substância de estrutura química definida,

podendo ser uma molécula nova ou já conhecida acompanhada de uma ou mais atividade farmacológica” (JÚNIOR, A, R, O; COSTA, A, M. 2016).

As espécies do gênero *Campomanesia*, pertencentes à família Myrtaceae, compreendem cerca de 38 espécies presentes no Brasil. As espécies de *Campomanesia* são produtoras de folhas, frutos e flores, os quais possuem grande potencial e interesse pelas características organolépticas que apresentam. Sua exploração, todavia, é extrativista, em função do seu habitat que vem sendo desmatado devido aos interesses urbanos. Tais espécies vegetais possuem elevadas porcentagens de flavonoides, moléculas que exibem atividades antioxidante e fotoprotetora comprovadas na literatura (BARBOSA, 2015).

A *Campomanesia sessiliflora*, popularmente conhecida e denominada de guabioba-verde, é encontrada com frequência no Cerrado e em regiões mais restritas de campos do Brasil central, como por exemplo, em Minas Gerais e no Mato Grosso do Sul (KATAOCA; CARDOSO, 2013). Essa espécie é restritamente conhecida pela literatura, porém é relatada a presença de compostos fenólicos em extratos da planta, em que se destacam os taninos condensados e hidrolisáveis e os flavonoides, moléculas que lhe conferem um alto potencial antioxidante, fotoprotetor, anti-inflamatório, antimicrobiano e antinociceptivo (BARBOSA, 2015).

Estes produtos de origem natural apresentam potencial quimiopreventivo em animais e bioensaios, os quais são associados a atividade antioxidante. Como suplementos dietéticos, neutralizam os efeitos adversos do stress oxidativo e protegem dos efeitos nocivos da oxidação (QUINO, C, F. et,al. 2016). Os taninos são constituintes vegetais, definidos como compostos fenólicos, solúveis em água, que, em reações fenólicas usuais, têm poder de precipitar alcaloides, gelatinas e outras proteínas. Os flavonoides, são compostos fenólicos, que de acordo com o grau de oxidação de seu anel central são subdivididos em várias classes. Nas folhas, apresentam sistemas mais complexos e são conhecidos por absorverem luz UV (SANTOS, M, D. et, al. 1998).

Inúmeras bactérias estão introduzidas no dia-a-dia do homem e, em algumas situações, acabam sendo a causa de enfermidades (SOUSA, A, T, L; ANDREZA, R, S; ALVES, E, F et al. 2015). O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), uma bactéria gram-positiva, é conhecida por estar presente na flora normal do ser humano, a qual pode, entretanto, levar à infecções leves até mais graves, causando distintos tipos de intoxicações e infecções purulentas. A *Escherichia coli* (*E. coli*), uma bactéria gram-negativa, é uma das principais causadoras de infecções no trato urinário, além de doenças diarreicas. A *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), outra

bactéria gram-negativa, é um patógeno humano conhecido principalmente por ter envolvimento com pacientes imunossuprimidos e também com infecções hospitalares. A *E. coli* e a *P. aeruginosa* exibem poder contra antibióticos e antissépticos, sendo reconhecidas como cepas resistentes (TINTINO, S, R; CUNHA, F, A, B; SANTOS, K, K, A et, al. 2013).

Embora as espécies de *Campomanesia* apresentem alto teor de compostos fenólicos, com grande potencial farmacológico, principalmente nas folhas, seu estudo é muito limitado. Portanto, considerando a diversidade de plantas medicinais do Cerrado pouco estudadas; a necessidade de descoberta de novos antioxidantes e antimicrobianos, bem como o potencial terapêutico da *C. sessiliflora* já utilizada popularmente, o presente estudo se propôs a obter e caracterizar físico-química e microbiologicamente os extratos hexânico e metanólico das folhas de *C. sessiliflora*, com vistas a uma potencial utilização farmacológica da mesma.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Obter e caracterizar os extratos hexânico e metanólico das folhas de *Campomanesia sessiliflora*.

3.2 Objetivos específicos

Extrair e obter significativa quantidade de extratos hexânico e metanólico de folhas de *Campomanesia sessiliflora*;

Avaliar o pH dos extratos hexânico e metanólico de folhas de *Campomanesia sessiliflora*;

Determinar o conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos hexânico e metanólico de *Campomanesia sessiliflora*;

Investigar o potencial antimicrobiano dos extratos hexânico e metanólico da espécie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Folhas de *C.sessiliflora* foram coletadas na região de Monjolinho (latitude 18°46'15"S e longitude 46°14'50"W), no município de Lagoa Formosa, Minas Gerais, Brasil. Após a coleta, o material foi mantido em freezer a uma temperatura de -80°C. Posteriormente, as folhas foram liofilizadas por 48 horas e, em seguida, foram trituradas e armazenadas à temperatura ambiente até o uso. A espécie foi identificada pela Profa. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira.

4.2 Obtenção dos extratos hexânico e metanólico das folhas de *Campomanesia sessiliflora*

As folhas de *C.sessiliflora* foram submetidas à extração exaustiva a frio, utilizando-se hexano ou metanol como solventes. Cerca de 70 gramas do material vegetal foi misturado e homogeneizado com 470 mL de hexano ou metanol à temperatura ambiente e mantido em repouso por 72 horas. Após esse período, a mistura foi filtrada para retirada das partículas grossas. Em seguida, os extratos foram concentrados sob vácuo em rotaevaporador (Marca: Fisatom. Modelo:802), obtendo-se, assim, o extrato bruto hexânico e metanólico.

4.3 Avaliação do pH dos extratos hexânico e metanólico de *Campomanesia sessiliflora*

O potencial hidrogeniônico (pH) dos extratos foi obtido a partir de procedimentos padrão. Assim, para a análise de pH do extrato hexânico das folhas de *C.sessiliflora*, foram pesados 0,5 gramas do extrato com o auxílio de uma balança analítica. Em uma proveta de 10 mL, preparou-se uma solução extrato hexânico/ água (1:1, v/v), homogeneizou-se durante 1 minuto, observando-se a formação de duas fases. A fase de interesse (hexânica) foi transferida para um béquer para a medição do pH. Para o extrato metanólico das folhas de *C.sessiliflora*, pesou-se 1,0 grama da amostra, os quais foram diluídos em 10 mL de água destilada. As leituras foram feitas em um medidor de pH de bancada (Marca: ION. Modelo: PHB500), previamente calibrado para os pHs 4,0 e 7,0 à temperatura ambiente. As análises foram realizadas em triplicata.

4.4 Quantificação do conteúdo de fenólicos totais nos extratos hexânico e metanólico de *Campomanesia sessiliflora*

Para determinação do conteúdo fenólico total, os extratos foram submetidos à reação colorimétrica descrita por Swain e Hills (1959), em que o reagente de Folin-Ciocalteu é reduzido pelos compostos fenólicos contidos na amostra, resultando na formação de uma coloração azul intensa. Dessa forma, quando mais intensa a cor azul, maior o teor de fenólicos totais presentes na amostra. A curva padrão foi realizada utilizando-se o ácido gálico, que é um dos compostos fenólicos mais abundantes nas folhas dos vegetais. Os resultados do conteúdo de fenólicos totais medidos nos extratos hexânico e metanólico foram comparados à curva padrão de ácido gálico e expressos em microgramas de equivalentes de ácido gálico em 1 g de amostra (mg Eq AG/ g de amostra).

A análise de fenólicos totais contidos no extrato hexânico das folhas de *C. sessiliflora* foi realizada de acordo com Koseoglu e colaboradores (2016), com algumas modificações. Dessa forma, pesou-se 1,0 grama da amostra, a qual foi dissolvida em 2 mL de hexano. Em seguida, à solução hexânica foram adicionados 2 mL de uma solução metanol/ água (60:40, v/v), homogeneizando-se em vórtex por, aproximadamente, 2 minutos. Posteriormente, a solução foi submetida à centrifugação (3500 rpm, 10 minutos) para separação das fases metanólica e hexânica. Retirou-se, então, 80 µL da fase metanólica e completou-se com mais 2 mL de água destilada em um tubo de ensaio. Na sequência, adicionou-se 0,27 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, foi adicionado 0,54 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) (35 %). A amostra foi completada com água até atingir um volume final de 5,40 mL. Após 2 horas de incubação, a leitura da absorbância foi feita em um espectrofotômetro a 760nm (Marca: Gehaka. Modelo:UV – 340G). Para a análise do conteúdo fenólico total do extrato metanólico, foram feitas três diluições do extrato: 125 µg/ mL, 250 µg/ mL e 500 µg/ mL. Em tubos de ensaio, foram pipetados 500 µL de cada amostra. Em seguida, adicionou-se 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu a 10% a cada tubo e 2 mL de Na₂CO₃(7,5 %). Posteriormente, a mistura foi mantida em banho-maria a uma temperatura de 50°C por 5 minutos. As amostras foram retiradas do banho e resfriadas até a temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 760 nm. O teor de fenólicos totais foi expresso em µg por grama de extrato.

A curva padrão foi construída a partir de sete concentrações de ácido gálico: 0 (branco), 10, 20, 30, 40, 50 e 100 µg/ mL. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 760 nm. O teste de fenólicos totais foi realizado em triplicata.

4.5 Linhagens bacterianas e teste do potencial antimicrobiano dos extratos hexânico e metanólico das folhas de *Campomanesia sessiliflora*

As linhagens bacterianas utilizadas para a avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos hexânico e metanólico de *C. sessiliflora* são isolados clínicos pertencentes ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia, campus Patos de Minas. As cepas utilizadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos hexânico e metanólico foram testadas pelo método de difusão em ágar. As culturas microbianas foram preparadas a partir de colônias isoladas das cepas descritas acima e colocadas em uma quantidade suficiente de solução salina contidas em tubos de ensaio. A turvação da suspensão foi comparada à escala padrão de MacFarland, correspondente a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ mL. Em seguida, as colônias foram semeadas em placas de Petri, utilizando-se um *swab* estéril para cada cepa.

Os extratos hexânico e metanólico das folhas de *C. sessiliflora* foram utilizados em três concentrações diferentes: 125, 250 e 500 mg/ mL dissolvidos em DMSO. Para a análise da resposta antimicrobiana dos extratos, foram utilizados discos de papel filtro estéreis, com aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, para cada diluição. Os controles consistiram de um disco para DMSO e um disco para controle do solvente correspondente ao extrato testado (hexano ou metanol). Assim, os discos (com os controles e com as diluições de cada extrato) foram embebidos de amostra e colocados sobre a placa de Petri contendo cada cepa bacteriana (*S. aureus*, *P. aeruginosa* ou *E. coli*). Amoxicilina clavulanato (AMC) e Aztreonam (ATM) foram utilizados como antibióticos controle. As análises para cada concentração de cada extrato foram realizadas em duplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das folhas de *C. sessiliflora* (Figura 1), guabiroba-verde, foram obtidos extratos hexânico e metanólico, os quais foram submetidos à análises de pH, determinação do conteúdo fenólico total e avaliação da resposta antimicrobiana. Os resultados e sua discussão correspondente são apresentados a seguir.



Figura1. Folha e fruto representativos da espécie em análise, *Campomanesia sessiliflora* (guabiroba-verde).

Após o processamento das folhas para obtenção dos extratos hexânico e metanólico, foi calculado o rendimento das extrações. Dessa forma, o rendimento para cada extrato foi calculado com base na equação a seguir:

$$R = \frac{Mf}{M0} \times 100$$

R = rendimento do extrato em porcentagem (g/ 100 g de amostra)

Mf = massa do extrato medida ao final da extração (g)

M0 = massa da amostra inicial (g)

100 = fator de conversão para porcentagem

O extrato hexânico (Figura 2A) apresentou um rendimento de 7,28 %, enquanto o rendimento do extrato metanólico foi de 33,20 % (Figura 2B). Para essa diferença no rendimento obtido, é importante considerar que os dois solventes utilizados apresentam polaridades diferentes. Dessa maneira, o metanol é capaz de extrair moléculas menores da planta, tais como taninos, fenóis e flavonoides, as quais são moléculas descritas na literatura por possuírem propriedades farmacêuticas (BARBOSA, 2015). O hexano, entretanto, extrai moléculas maiores como carboidratos, lipídeos e ácidos nucléicos de cadeias maiores, que são responsáveis por atribuir o valor nutricional dos alimentos. Ainda, em comparação com pesquisas anteriores (TINTINO, S, R; et, al. 2013), ambos os extratos hexânico e metanólico apresentaram um maior rendimento, utilizando-se menores quantidades de material vegetal e menores volumes de reagente orgânico, o que pode representar uma otimização do processo de extração.



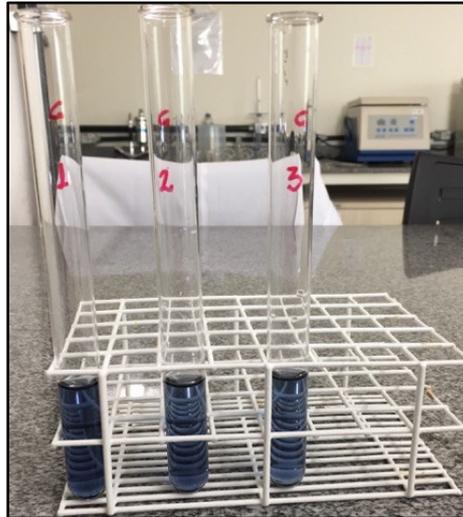
Figura2. Extratos brutos hexânico (A) e metanólico (B) das folhas de *C. sessiliflora*.

As medidas de pH, realizadas à temperatura ambiente, para o extrato bruto hexânico das folhas de *C. sessiliflora* resultaram em um valor de $5,05 \pm 0,04$ e de $4,026 \pm 0,005$ para o extrato bruto metanólico da planta (resultados médios obtidos de três experimentos independentes). Um estudo realizado com o extrato etanólico das folhas de *Campomanesia adamantium* (BARBOSA, R, M, A; 2015) evidenciou um valor de pH um pouco superior (em torno de $5,30 \pm 0,01$) aos encontrados no presente estudo. A medição do pH é importante para avaliar a acidez e a alcalinidade de um composto. O pH é um parâmetro importante para formulações a base de extratos vegetais e a acidez dos extratos sugere a presença de substâncias como compostos

fenólicos e derivados, que possuem caráter ácido (BORELLA; CARVALHO, 2011). Além disso, a característica do pH ácido é um dado determinante na escolha dos adjuvantes empregados na formulação cosmeceútica, influenciando na estabilidade das formulações (NUNES; SILVA; REZENDE, 2003).

A determinação de fenólicos totais para o extrato hexânico das folhas de *C. sessiliflora* resultou em $170 \pm 9,464$ mg Eq AG/ g de extrato (Figura 3A), enquanto o extrato metanólico apresentou $128,81 \pm 2,4148$ mg Eq AG/ g de extrato (Figura 3B). Essa pequena diferença, sendo o conteúdo fenólico total um pouco maior no extrato hexânico, pode ser explicada em razão de que os compostos fenólicos possuem grupos químicos distintos que se ligam com o solvente de acordo com sua polaridade (VIEIRA, M, L; et, al. 2015).

A)



B)



Figura 3. Teste representativo para determinação de fenólicos totais, utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu, para os extratos hexânico (A) e metanólico (B) das folhas de *C. sessiliflora*. Para o extrato metanólico (B): Tubos 1, 2 e 3 representam concentrações de 125, 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

Os resultados obtidos em ambos os extratos são bastante consideráveis. Em comparação com dados da literatura, por exemplo, o conteúdo fenólico total encontrado no presente estudo supera em muitas vezes o de outros autores (BARBOSA, R, M, A; 2015). É importante ressaltar, nesse caso, que essa divergência de resultados pode ser estabelecida em função das espécies estudadas, uma vez que Barbosa (2015) trabalhou com a *Campomanesia adamantium*. Ainda, sabe-se que as características individuais de cada planta, bem como seu local de cultivo, podem influenciar de forma importante distintos parâmetros experimentais. Segundo Piddock, (2006), fatores como época, manejo e horário da colheita influenciam fortemente na ausência ou na presença de certos constituintes químicos. Portanto, os extratos hexânico e metanólico das folhas de *C. sessiliflora* apresentam um significativo teor de fenólicos totais, os quais representam metabólitos secundários de grande importância para a Farmacologia.

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos das folhas de *C. sessiliflora* mostrou um resultado significativo para inibição da cepa de *S. aureus* pelo extrato metanólico. O crescimento dessa cepa bacteriana foi inibido em todas as concentrações de extrato metanólico testadas de maneira concentração dependente (Tabela 1, Figura 4). O extrato metanólico da folha da planta apresenta agentes terapêuticos, como metabólitos secundários (SANTANA, P, S; ANDREZA, R, S et al., 2016), que possibilitaram a sensibilidade de *S.*

aureus, um microrganismo conhecido por causar infecções hospitalares em humanos, além de diferentes tipos de intoxicações e, principalmente, infecções purulentas (furúnculo, endocardite, miocardite, abscesso, meningite) (TINTINO, R, S, et al., 2013). *S. aureus* pertence à gama de bactérias gram-positivas. Outros estudos com outras bactérias gram-positivas são interessantes para um melhor conhecimento da atividade antimicrobiana do extrato metanólico das folhas de *C. sessiliflora*.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do extrato metanólico das folhas de *C. sessiliflora*.

Microrganismo	Concentração (mg/ mL)			Antibiótico		Controle	
	125	250	500	ATM	AMC	DMSO	CH ₃ OH
<i>S. aureus</i>	12,5 ± 13		16,5 ±	-	46,5 ±	-	-
ATCC25923	0,7	± 0	0,7		2,12		
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-	29,5	-	-	-
ATCC27853				± 0,7			
<i>E. coli</i>	-	-	-	33,5	17,5 ±	-	-
ATCC25922				± 0,7	2,12		

Os resultados do teste de difusão em ágar são apresentados em mm, com a média da duplicata e o desvio padrão. Houve formação de halo de inibição para *S. aureus* nas três concentrações do extrato metanólico das folhas de *C. sessiliflora*.

Já para as cepas de *P. aeruginosa* e *E. coli*, os extratos não apresentaram atividade. Não há relatos na literatura de extratos de *Campomanesia* que exibam atividade inibitória nesses microrganismos. Os antibióticos já conhecidos e testados para controle foram eficazes com AMC para *E.coli* e *S. aureus*, e com ATM para *E.coli* e *P. aeruginosa*.

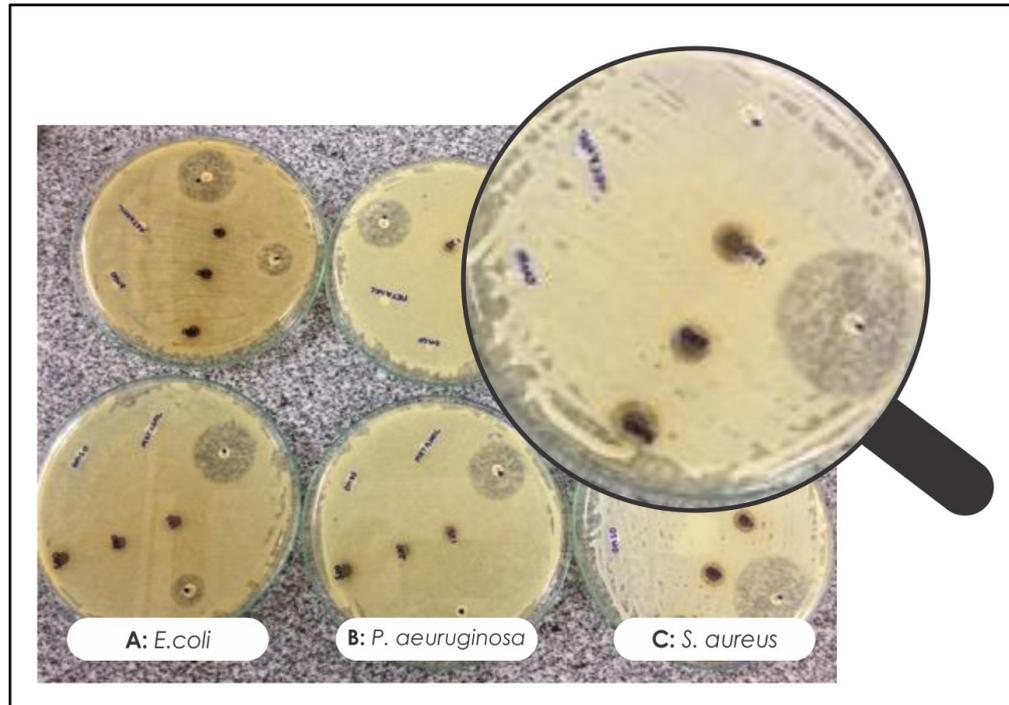


Figura 4. Experimento representativo da atividade antimicrobiana do extrato metanólico das folhas de *C. sessiliflora*, utilizando-se as cepas de (A) *E. coli*, (B) *P. aeruginosa* e (C) *S. aureus*.

Os resultados de atividade antimicrobiana para o extrato hexânico nas diferentes concentrações testadas não foi significativo para nenhuma das cepas bacterianas em estudo (*S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*) (Tabela 2, Figura 5). Os antibióticos utilizados para controle positivo foram eficazes na inibição do crescimento dos respectivos microrganismos: AMC para *E. coli* e *S. aureus* e com ATM para *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana do extrato hexânico das folhas de *C. sessiliflora*.

Microrganismo	Concentração (mg/ mL)			Antibiótico		Controle	
	125	250 μ l	500 μ l	ATM	AMC	DMSO	C ₆ H ₁₄
<i>S. aureus</i> ATCC25923	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	-	-	-	35 \pm 4,24	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC25922	-	-	-	34 \pm 1,41	15,5 \pm 0,7	-	-

Os resultados dos testes de difusão em ágar são apresentados em mm, com a média da duplicata e o desvio padrão. Não houve formação de halo de inibição em nenhuma das concentrações do extrato hexânico das folhas de *C. sessiliflora* testadas.

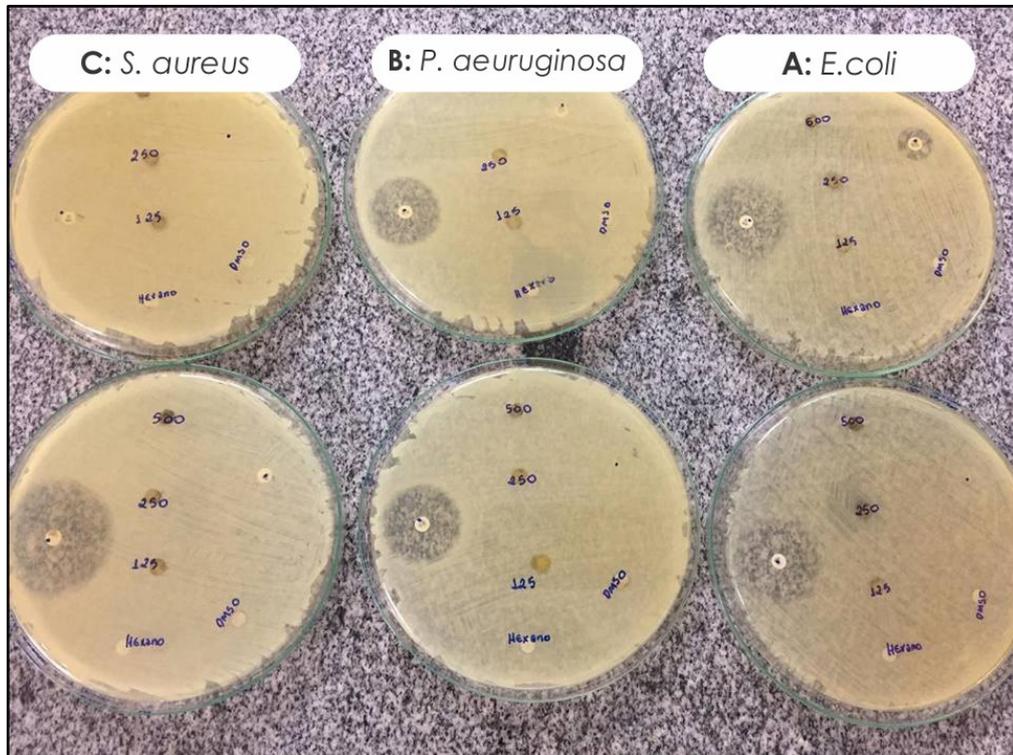


Figura 5. Experimento representativo da atividade antimicrobiana do extrato hexânico das folhas de *C. sessiliflora*, utilizando-se as cepas de (C) *S. aureus*, (B) *P. aeruginosa* e (A) *E. coli*.

Os resultados de atividade antimicrobiana do extrato metanólico obtidos no presente estudo evidenciam que os produtos naturais isolados da *Campomanesia sessiliflora* apresentam um grande potencial de utilização como compostos bioativos no desenvolvimento de formulações para o tratamento de doenças infecciosas (SANTANA, P, S; ANDREZA, R, S et al., 2016).

Em conjunto, os dados desse estudo demonstram que os extratos das folhas de *C. sessiliflora* possuem uma grande quantidade de compostos fenólicos totais, possivelmente flavonoides, que são moléculas responsáveis por exibirem atividades antitumorais, anti-inflamatória e antimicrobiana.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu determinar o alto conteúdo fenólico presente nos extratos hexânico e metanólico das folhas de *C. sessiliflora*. Esse resultado aponta para estudos futuros, como ensaios fitoquímicos por exemplo, visando a detecção de moléculas específicas a serem utilizadas no desenvolvimento de fármacos com ação antioxidante, anti-inflamatória e anti-nociceptiva. O pH indicou que os extratos obtidos são ácidos e com pH próximo ao fisiológico de várias partes do organismo, o que pode acarretar positivamente na elaboração de um produto final. Finalmente, as folhas de *Campomanesia sessiliflora* mostraram resultados significativos para a atividade antimicrobiana. O extrato obtido a partir do tratamento da folha com metanol foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Esse dado é muito relevante, uma vez que *S. aureus* é um microrganismo causador de muitas infecções. Nesse sentido, tal extrato fundamenta o uso da planta como um agente antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, Q, F. et, al. Atividade antimicrobiana *in vitro* das folhas de araçá (*Psidiumcattleianum*Sabine) contra microrganismos da mucosa oral. Universidade Estadual de Montes Claros e Universidade Estadual Paulista. **Revista odontol.** UNESP Vol. 45. No.3. Araraquara-SP, Junho 2016.
- ARRAIS, L, G. et, al. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de CrotonpulegioidesBaill. (Zabelê). Universidade Federal de Pernambuco. **Revista Bras. Pl. Med., Campinas**, v.16. No.2. Recife-PE, 01/2014.
- BARBOSA, R. M. A. et al. **Avaliação da Atividade Antioxidante e Fotoprotetora do Extrato Etanólico deCampomanesiasessiliflora.** Universidade Católica Dom Bosco. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia. Campo Grande – MS, Março de 2015.
- BERGMANN, D. Guiade Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos. ANIVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2ª edição. **Revista – Brasília.**Brasília – DF, 2008.
- BORELLA, J, C; CARVALHO, D, M, A. Avaliação comparativa da qualidade de extratos de Calendula officinalis L. (Asteraceae) comercializados em farmácias de manipulação em Ribeirão Preto – SP. Universidade de Ribeirão Preto UNAERP. **Revista brasileira de farmácia (RBF).** Vol. 92. No. 1. Ribeirão Preto, 2011.
- CRUZ, A, J, F. et, al. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora dos extratos metanólico e hexânico da folha de *Allium cepa*. **Revista Ciencia Salud.** Vol. 14. No. 2. Bogotá. Maio/Agosto 2016.
- JÚNIOR, V, F, V. PINTO, A C. MACIEL, M, A, M. Plantas medicinais: cura segura?Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Revista Química Nova**, vol. 28. No. 3. São Paulo, Maio/Junho 2005.

JUNIOR, A, R, O; COSTA, A, M. **Plantas Para Uso Medicinal e Cosmético**. Disponível em:http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj_pot_regionais/plantas.pdf . Acesso em: 13 de Setembro, 2016.

KATAOKA, V.M.F; CARDOSO, C.A.L. Avaliação do perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD e da atividade antioxidante das folhas de espécies *Campomanesia sessiliflora* (O. Berg) Mattos e *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **Revista bras. plantas med.** vol.15 no. 1 Botucatu, 2013.

KLINK, C, A; MACHADO, R, B. **A Conservação do Cerrado Brasileiro**. Universidade de Brasília (UnB) e Conservação Nacional e Núcleo de Referência em Ciências Ambientais do Tópico Ecotonal do Nordeste (TROPEN). DF – Brasil, Julho de 2005.

KOSEOGLU, O; SEVIM, D; KADIROGLU, P. Quality Characteristics and Antioxidant Properties of Turkish Monovarietal Olive Oils Regarding Stages of Olive Ripening. Ministry of Food, Agriculture and Livestock, Directorship of Olive Research Institute, department of Food Technologies, science and Technology University, Department of Food Engineering. **Magazine: FoodChemistry**. Turquia. Junho 2016.

LIMA, P, S; **Frutos do Cerrado como cosméticos, corantes e condimentos**. Universidade Federal de Goiás como requisito para Bacharel em Engenharia de Alimentos. Goiânia – GO, 2012.

MACIEL, M. A. M. et, al. Plantas Medicinais a Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Revista Química Nova** vol. 25 no, 3 Rio De Janeiro - RJ, 2002.

QUINO, C, F; et, al. Características fitoquímicas y capacidad antioxidante in vitro de *Aloe vera*, *Plukenetia volubilis*, *Caiophora carduifolia*, *Cecropea membranacea*. Unidad de Posgrado, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos et.al. **Revistas de investigación UNMSM**. Vol. 77. No. 1. Lima-Peru, 2016.

RODRIGUEZ, J. M. F. et, al. **Avaliação Antimicrobiana de Extratos Naturais**. Universidade Estadual do Centro-Oeste. Anais da XIX Semana da Iniciação Científica. Guarapuava – PR, 11/2014.

SANTANA, P, S. et, al. Efeito antibacteriano e antifúngico de extratos etanólico, hexânico e metanólico a partir de folhas de *kalanchoepinnata* (Lam.) Pers. (Malva corama) contra cepas multi-resistente a drogas. Faculdade Leão Smapaio. **Revista Biota Amazônica**. Vol. 6. No. 1. Macapá. Janeiro 2016.

SANTOS, M, D; et, al. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Revista bras. Bot.** Vol. 21 No.. 2 São Paulo Agosto, 1998.

SOUSA, A, T, L. et, al. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólico e hexânico do caule folhado de *Melissa officinalis*. **Revista CienciaSalud**. Vol.14. No. 2. Bogotá. Maio/Agosto 2016.

TINTINO, S, R. et, al. Atividade moduladora dos extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus cf. arabicus* sobre drogas antimicrobianas. **Revista Brasileira de Biociência**. Vol. 11. No. 2. Porto Alegre. Abril 2013.

VIEIRA, L, M . et, al. Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase dos extratos de *Myracrodru onurundeuva* Fr. All. (Anacardiace). Laboratório de química Tecnológica; Instituto Federal de Educação; Tecnologia Câmpus Rio Verde; Rodovia Sul Goiano et, al. **Revista brasileira, Plantas Mecediniais**. Vol. 17. No. 4. Botucatu. Dezembro 2015.