



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR - PPBM

LUZIA PAULO DA CRUZ

**VALIDAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, MODIFICADORA DA
ATIVIDADE DE ANTIBIÓTICOS, ANTIPARASITÁRIA E CITOTÓXICA DOS
EXTRATOS HIDROALCOÓLICO E ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Licania rigida*
BENTH (OITICICA)**

CRATO – CE

2019

LUZIA PAULO DA CRUZ

**VALIDAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, MODIFICADORA DA
ATIVIDADE DE ANTIBIÓTICOS, ANTIPARASITÁRIA E CITOTÓXICA DOS
EXTRATOS HIDROALCOÓLICO E ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Licania rigida*
BENTH (OITICICA)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular-PPBM da Universidade Regional do Cariri - URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Linha de Pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Regina Kerntopf

CRATO – CE

2019

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri – URCA
Bibliotecária: Ana Paula Saraiva CRB 3/1000

Cruz, Luzia Paulo da.
C955v Validação das atividades antibacteriana, modificadora da atividade de antibióticos, antiparasitária e citotóxica dos extratos hidroalcoólico e etanólico das folhas de *Licania rigida* Benth (Oiticica)/ Luzia Paulo da Cruz. – Crato-CE, 2019
67p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA; Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais; Linha de pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais.
Orientadora: Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf

1. *Licania rígida*, 2. Atividade antibacteriana, 3. Atividade antiparasitária, 4. Citotoxicidade; I. Título.

CDD: 615.372

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular / Área de Concentração em Bioprospecção de Produtos Naturais, outorgado pela Universidade Regional do Cariri, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

Luzia Paulo da Cruz

Dissertação aprovada em: 31/07/2019

Examinadores:

Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf Mendonça
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr.^a Roseli Barbosa

Prof. Dr. Saulo Relison Tintino

Prof. Dr. Luis Rafael Leite Sampaio

Dedico a minha Mãe Maria Diva Paulo da Cruz que sempre foi a pessoa que mais acreditou em mim e investiu para realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas graças recebidas, pelas oportunidades a mim ofertadas, pela sabedoria de minhas escolhas e principalmente por colocar pessoas tão maravilhosas em minha vida.

A minha mãe Maria Diva Paulo da Cruz, minha Heroína, meu exemplo de vida. Muito obrigada mãe por sempre acreditar em mim, pelo apoio incondicional e por sempre fazer de tudo para que eu realize meus sonhos.

A meu pai Francisco José da Cruz pelo apoio, incentivo e por fazer eu me sentir especial com todo carinho e atenção que me dedicou.

Ao meu esposo Regilanio da Silva, que me apoiou, me incentivou e durante boa parte do mestrado foi meu financiador.

A meus irmãos Iva Paulo, José Ivan, Cicero Ivandilson, Maria Ivanir e Maria Ivonete, por serem meu refúgio e fortaleza durante todo percurso. Em especial quero agradecer a minhas irmãs Cicera Janiete e Maria Ivandilma pela amizade, pelas conversas de incentivo e pelos momentos de estudo juntas.

A toda minha família, meus sobrinhos, tios, minha avó e primos que sempre me ofereceram um ambiente aconchegante e acolhedor.

A Minha Orientadora Professora Marta Regina Kerntopf por ter me acolhido, pela confiança demonstrada, pelos ensinamentos que vão além dos acadêmicos e pela valiosa orientação.

A Enaide Soares Santos e Cícera Norma Fernandes Lima pela amizade e parceria durante a realização deste trabalho.

A Diogenes Queiroz Dias pela ajuda na execução do projeto, e pelo ensinamento ao longo desse tempo.

A Gyllyandeson de Araújo Delmondes, colega de turma e parceiro de laboratório, um verdadeiro presente! Muito obrigada pelas contribuições para esse trabalho.

A Jéssica Pereira de Sousa, colega de laboratório que se tornou uma verdadeira amiga. Muito obrigada por sempre me ouvir, me aconselhar, tirar dúvidas, por ser verdadeiramente minha parceira nessa jornada!

Aos meus colegas de turma do mestrado que compartilharam comigo momentos de muito aprendizado.

Aos colegas do LFPN e LFCE por fazerem a rotina do laboratório agradável, por tornar o laboratório tão acolhedor e pelo conhecimento que cada um compartilhou comigo ao longo desse tempo.

Ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular-LMBM.

Aos Professores Dra. Roseli Barbosa, Prof. Dr. Luiz Marivando Barros e Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, pela gentileza de participarem da minha banca de qualificação.

Aos professores Dra. Roseli Barbosa, Dr. Saulo Relison tintino e Dr. Luis Rafael Leite Sampaio por participarem de minha banca de defesa.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, a Coordenadora Prof^ª. Dr^ª. Maria Arlene Pessoa da Silva e a todos os docentes pela minha formação acadêmica.

À secretária do Programa, Maria Andecieli Rolim de Brito, por ser solícita e estar sempre à disposição para atender e ajudar aos alunos.

Agradeço também à Universidade Regional do cariri-URCA por fornecer as estruturas físicas para a realização dos meus experimentos.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP pela concessão de bolsa.

Ao CNPQ.

À CAPES.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram de alguma forma a conquistar essa vitória! Muito obrigada!

*“Todos nós em algum momento somos forçados a nos olhar no espelho
e ver quem realmente somos”.*

Professor Hundert (O Clube do Imperador - 2002)

RESUMO

Doenças infecciosas ainda persistem devido à falta de estudos científicos, negligência do governo ou falhas do sistema público de saúde ou ainda devido ao mau uso dos medicamentos pela população fazendo com que os organismos causadores dessas enfermidades adquiram resistência a terapia. Atualmente vários pesquisadores tem se dedicado na busca de novas alternativas para o tratamento das doenças infecciosas especialmente para as bacterianas e parasitárias e vários estudos vem comprovando o potencial das plantas medicinais como terapia para essas enfermidades. Espécies da família Chrysobalanaceae especialmente as do gênero *Licania* são descritas na literatura como sendo bastante utilizadas para fins terapêuticos e profiláticos como tratamento de diabetes e inflamações e possuem ação antioxidante, antibacteriana, antidiarreica e antiespasmódica. Este estudo teve como objetivo identificar a composição dos extratos hidroalcoólico (EHFLR) e etanólico (EEFLR) das folhas de *Licania rigida* por meio de LC-MS, avaliar as atividades antibacteriana e modificadora da atividade antibacteriana, antiparasitária e citotóxica. Os testes antibacterianos foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, a atividade antiparasitária pela metodologia de Vega et al. (2005) e a ação citotóxica com células de mamíferos. Os resultados mostraram nos dois extratos de *L. rigida* a presença de constituintes químicos como derivados de miricetina, derivado de miricetina glicosilado e derivado de miricetina ramnosídeo, sendo que o EEFLR apresentou ainda um derivado quercetina glicosilado. Para ambos os extratos estudados a CIM foi $\geq 1024 \mu\text{g} / \text{mL}$. O EEFLR quando associado a vancomicina apresentou sinergismo frente *Staphylococcus aureus* sendo observado uma redução de 50% na concentração do antibiótico. A habilidade que produtos naturais têm de modificar a ação de antimicrobianos pode ser vista a partir de estudos que comprovam que associação de antibióticos e extratos de plantas podem atuar revertendo a resistência das bactérias, dificultando a bomba de efluxo ou modificando parede celular bacteriana e a membrana celular. O EHFLR apresentou moderada toxicidade nos fibroblastos com $CL_{50}=554,58 \mu\text{g} / \text{mL}$ e foi efetivo apenas contra a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* na concentração de $1.000 \mu\text{g}/\text{mL}$ apresentando uma $CE_{50}=726,99 \mu\text{g} / \text{mL}$. O EEFLR, apresentou baixa toxicidade para os fibroblastos com uma $CL_{50} \geq 1000$, entretanto, não apresentou eficácia contra os parasitas testados com uma $CE_{50} \geq 1000 \mu\text{g} / \text{mL}$, apresentando apenas uma pequena atividade contra as formas promastigotas na maior concentração testada. Os resultados mostraram que nenhum dos extratos estudados apresentou atividade antibacteriana *in vitro*. Entretanto o EEFLR modificou de forma sinérgica a atividade do antibiótico padrão vancomicina contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e o EHFLR demonstrou atividade antiparasitária contra o *T. cruzi*.

Palavras-chave: *Licania rígida*, Atividade antibacteriana, Atividade antiparasitária, Citotoxicidade.

ABSTRACT

Infectious diseases persist due to lack of scientific studies, failures of the public health system, as well as misuse of medicines, from that, results in the infective agents to be therapy-resistant. Nowadays, researchers aim for new alternatives on infectious diseases treatment, especially for bacterial and parasitic, and several studies have been proving the potential of medicinal plants as therapy for these conditions. Chrysobalanaceae family species, such those of the genus *Licania*, are reported for its wide therapeutic and prophylactic usage, treating illnesses like diabetes, besides its antibacterial, antidiarrheal, antispasmodic activity and anti-inflammatory properties. This study aimed to identify the composition of hydroalcoholic (EHFLR) and ethanolic (EEFLR) extracts of *Licania rigida* leaves by LC-MS, evaluate its antibacterial and modifying antibacterial action, further, antiparasitic and cytotoxic activity. The antibacterial assays were performed by the broth microdilution method, the antiparasitic activity tests complying with Vega et al. (2005) and the cytotoxicity using mammalian cells. Chemical composition assessment for the two *L. rigida* extracts indicates a presence of myricetin derivatives such as glycosylated myricetin derivatives and ramoside myricetin derivatives also EEFLR presented a glycosylated quercetin derivative. For both extracts studied the MIC $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. The EEFLR associated with vancomycin showed synergism against *Staphylococcus aureus* with a 50% reduction of antibiotic concentration. Studies of which antibiotics and plant extracts combination may act on reversing the bacteria resistance, hindering the efflux pump or modifying the bacterial wall and cell membrane prove that natural products can modify the action of antimicrobial agents. EHFLR evinced moderate toxicity to fibroblast cells with LC50 = 554.58 $\mu\text{g/mL}$ and effectiveness only against the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* at 1,000 $\mu\text{g/mL}$ concentration with an EC50 = 726.99 $\mu\text{g/mL}$. EEFLR had a low toxicity to fibroblasts with a LC50 ≥ 1000 , however, it was not effective against parasites tested with EC50 $\geq 1000 \mu\text{g/mL}$, with a slight effect against promastigote forms at the highest concentration tested. None of the surveyed extracts had antibacterial activity *in vitro* however, EEFLR synergistically modified the standard antibiotic (vancomycin) versus Gram-positive bacteria *S. aureus*. The EHFLR demonstrated antiparasitic activity counter *T. cruzi*.

Keywords: *Licania rigida*, Antibacterial activity, Antiparasitic activity, Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diferenças estruturais das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	20
Figura 2.	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 3.	Ciclo de vida do <i>Leishmania</i>	23
Figura 4.	Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Extrato hidroalcoólico e etanólico das folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR e EEFLR) e de antibióticos padrões contra cepas bacterianas.....	53
Figura 5.	Efeito da associação do Extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR) com antibióticos padrões, sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
Figura 6.	Efeito da associação do Extrato etanólico das folhas de <i>Licania rigida</i> (EEFLR) com antibióticos padrões, sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Tabela do gradiente de fase móvel utilizado para determinação qualitativa das amostras.....	46
Tabela 2.	LC-MS Análise cromatográfica do extrato Hidroalcoólico das folhas de <i>Licania rígida</i> (EHFLR).....	52
Tabela 3.	LC-MS Análise cromatográfica do extrato etanólico das folhas de <i>Licania rígida</i> (EEFLR).....	52
Tabela 4.	Atividade antiparasitária e citotóxica dos extratos EHFLR e EEFLR.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AE% – Percentual de atividade antiepimastigota

ANOVA – Análise de Variância

BHI – *Brain Heart Infusion*

CE₅₀ – Concentração Efetiva

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CL₅₀ – Concentração Letal

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DMSO – Dimetilsulfóxido

E.P.M. – Erro Padrão da Média

EEFLR – Extrato Etanólico das Folhas de *Licania rigida* EHFLR

– Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* HCDAL –

Herbário Cariense Dárdano de Andrade Lima HIA – *Heart*

Infusion Agar slants

LC-MS – Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa

M.G. – Média Geométrica

RM – Resistência Microbiana

SFB – Soro Fetal Bovino

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SISGEN – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Doenças Infeciosas.....	17
2.1.1 Doenças bacterianas.....	17
2.1.2 Doenças parasitárias.....	20
2.1.2.1 Tripanosomíase.....	20
2.1.2.2 Leishmaniose.....	22
2.2 Resistência Microbiana.....	25
2.3 Prospecção de Produtos Naturais.....	26
2.4 Família Chrysobalanaceae e Gênero <i>Licania</i>.....	27
2.5 <i>Licania rigida</i> (oitica).....	29
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
REFERÊNCIAS.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 ARTIGO - VALIDAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, MODIFICADORA DA ATIVIDADE DE ANTIBIÓTICOS, ANTIPARASITÁRIA E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICO E ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>Licania rigida</i> BENTH.	43
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS.....	64
Anexo A.....	65
Anexo B.....	66
Anexo C.....	67
Anexo D.....	68

1. INTRODUÇÃO

Atualmente demonstra-se uma preocupação em torno da conservação da natureza, assim como a procura por conhecimentos do uso sustentável dos recursos naturais. Uma forma eficiente para preservação dos recursos naturais refere-se a conscientização da população através da agregação de valor aos recursos naturais. Nesse sentido como uma forma de agregar valor às espécies vegetais está a bioprospecção que consiste na identificação e avaliação de material biológico encontrado na natureza para a obtenção de novos produtos ou processos. Pode-se realizar bioprospecção utilizando diferentes abordagens, entre elas: etnofarmacológica, quimiossistemática, via ecologia molecular e por tentativa-erro (ASTOLFI FILHO; SILVA; BIGI, 2014).

A humanidade vem testando e utilizando produtos naturais e se adaptando a estes desde seu início como civilização. O uso de plantas medicinais para terapia medicamentosa no organismo constitui-se de uma antiga prática humana e que ainda nos dias atuais pode ser observada em diferentes culturas. Levantamentos etnobotânicos recentes mostram relatos de comunidades que se utilizam de diversas plantas como terapia para as mais variadas doenças (RASTAGI et al., 2018; PANDA et al., 2018; TUASHA et al., 2018).

O uso de plantas medicinais deve estar baseado em conhecimento científico que comprove a eficácia e segurança e nesse contexto diversos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de validar as propriedades farmacológicas de diversas espécies de plantas tradicionalmente utilizadas para o tratamento de várias doenças, sendo que a maioria desses estudos têm se concentrado em tratamentos terapêuticos e preventivos para o câncer, doenças infecciosas, doenças do sistema nervoso central (Alzheimer e Parkinson), doenças inflamatórias, bacterianas, virais, asmáticas, psoríase, cardíacas, hipertensivas e diabéticas (CARNEIRO et al., 2014).

Diversos estudos têm se dedicado a busca de tratamento para as doenças infecciosas as quais são causadas por organismos patogênicos que invadem as células do hospedeiro para a sua reprodução e causam alteração no estado de saúde. Duas classes de doenças infecciosas têm recebido atenção especial de pesquisadores do mundo todo que são as doenças bacterianas e parasitárias, por se tratar de enfermidades que apresentam maior prevalência em comunidades de baixa renda e, além disso, serem negligenciadas durante muito tempo. Por

isso, essas enfermidades apresentam-se em uma alta incidência nos dias atuais (PIERCE et al., 2017).

Dentre o grupo de bactérias mais comuns que se apresentam nessas infecções temos as bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* que são cocos que fazem parte da microbiota humana sendo comumente encontrados na pele, mucosas do trato respiratório superior e intestino de humanos mas podem provocar doenças que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia, entre outras (ALMEIDA, MENDONÇA, FREITAS e VANDESME, 2016). Outro grupo bastante envolvido na maioria das infecções são as bactérias Gram-negativas. Como exemplo desse grupo temos a *Pseudomonas aeruginosa* um bacilo não fermentador que possui capacidade de produção de substâncias extracelulares, fatores de virulência, biofilmes, além de mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos a antimicrobianos, trata-se de um patógeno oportunista que apresenta resistência a diversos antimicrobianos, capaz de causar graves infecções nosocomiais agudas e crônicas (OLIVEIRA, 2018). Outra bactéria bastante comum a esse grupo é a *Escherichia coli*, um bacilo não esporulado, que habita normalmente o intestino da maioria dos animais, incluindo seres humano e pode indicar contaminação fecal devido às falhas higiênicas na manipulação de alimentos e ao uso de água contaminada (BRAOIOS et al, 2009).

Além das infecções causadas por bactérias, também temos algumas causadas por hemoparasitas. A leishmaniose é uma doença infecciosa que acomete o homem e outros animais vertebrados, causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas por mosquitos da subfamília Phlebotominae e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a cada ano 1,3 milhões de novos casos de leishmaniose ocorram, e destes, 20.000 a 30.000 mortes (GONTIJO, 2004; NEVES, 2004). Outra doença parasitária é a tripanossomíase causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é considerada uma antropozoonose de elevada prevalência e morbimortalidade sendo encontrada principalmente no continente americano (SEHN e ZANON 2019).

A falta de investimento no desenvolvimento de novos produtos somado a aspectos naturais dos microrganismos e o uso descontrolado de antibióticos contribuíram para o surgimento da Resistência Microbiana (RM) (LÓPEZ, 2017). A RM é um dos maiores problemas enfrentados pela saúde pública em todo o mundo de modo que alguns países têm se dedicado na busca não só de novos agentes terapêuticos, mas também de estratégias a fim de controlar a RM como a busca de substâncias capazes de preservar os antibióticos existentes através da modulação dos efeitos (WRIGHT, 2016).

Nesta perspectiva, a família Chrysobalanaceae apresenta-se como uma promissora fonte de novos compostos bioativos. Essa família de plantas lenhosas, com distribuição pantropical, têm indicações na medicina tradicional para tratamento de várias doenças, como malária, epilepsia, diarreia, sangramento, doenças venéreas e diabetes (FEITOSA et al., 2012). Alguns pesquisadores estudando espécies de Chrysobalanaceae descreveram atividade moluscicida (BILIA et al., 2000); antitumoral (FERNANDES et al., 2003); antioxidante, antiplasmodial e antileishmanial *in vitro*, antitripanossomal (ATTIOUA et al., 2012; SAWADOGO et al., 2012); potencial hepatoprotetor (OLALEYE et al., 2014); analgésica (ARAUJO-FILHO et al., 2016); propriedade antihiperlipidêmica (WHITE et al., 2016) para esta família.

A espécie *Licania rigida* popularmente conhecida como “oiticica” pertencente ao gênero *Licania*, da família Chrysobalanaceae. Atualmente encontramos poucos relatos científicos que buscam validar o potencial farmacológico de *L. rigida*, sendo esta relatada como uma promissora para o biodiesel (MACEDO et al. 2011); atividades inseticida e repelente contra *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (PESSOA et al., 2015) e atividades antioxidante e citotóxica (PESSOA et al., 2016).

Assim, diante da necessidade de busca por novas substâncias para o tratamento de doenças infecciosas e parasitárias, e levando em consideração o potencial farmacológico da família Chrysobalanaceae descrito na literatura, o presente trabalho buscou avaliar as atividades antibacteriana, modificadora da atividade de antibióticos, antiparasitária e citotóxica dos extratos hidroalcoólico e etanólico das folhas de *Licania rigida* Benth. (oiticica).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doenças Infecciosas

As doenças infecciosas são causadas por microrganismos patogênicos (por exemplo, bactérias, vírus, fungos e parasitas) que invadem as células do hospedeiro para a sua reprodução. Algumas doenças infecciosas são causadas por patógenos estritos, ou seja, microrganismos que estão sempre associados com doenças humanas. Todavia a maioria das infecções é causada por patógenos oportunistas, microrganismos membros da microbiota normal do paciente como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Esses microrganismos não provocam doenças em circunstâncias normais, mas sim quando introduzidos em locais estéreis como a corrente sanguínea e os tecidos (MURRAY et al., 2004).

Essas doenças representam graves problemas de saúde pública que afetam uma fração significativa da população mundial e, em razão do seu aspecto socioeconômico, representam um dos principais desafios para o século XXI, especialmente nas regiões mais pobres e vulneráveis do planeta (WHO, 2008).

Diante disso, a Organização Mundial de Saúde (OMS), prediz que as doenças infecciosas são responsáveis por aproximadamente um terço das causas de morbidade e mortalidade no mundo. As infecções causadas por bactérias e parasitas atualmente tem recebido a atenção de pesquisadores no mundo todo em busca de novas formas para o seu tratamento, isso porque as opções terapêuticas atuais são insuficientes e apresentam uma série de problemas, tais como baixa eficácia e elevada toxicidade; o processo de desenvolvimento de fármacos dessas patologias são complexos, longos e de alto custo (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008).

2.1.1 Doenças bacterianas

As bactérias são parte integral e inseparável da vida na terra. Elas podem ser encontradas em qualquer lugar. Revestem a pele, as mucosas e cobrem o trato intestinal dos homens e dos animais. Estão intrinsecamente ligadas às vidas de organismos e aos amplos ambientes em que habitam. Muitas bactérias são inofensivas. Algumas são benéficas para seu hospedeiro (homem, animal, planta) e provêm nutrientes ou proteção contra patógenos e doenças, limitando a habilidade de colonização de bactérias nocivas. Várias espécies de bactérias já foram identificadas

como causadoras de infecções, o que faz com que elas sejam alvos de grandes pesquisas. *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* são exemplos de organismos amplamente estudados por sua patogenicidade, responsáveis por diversos tipos de infecções (BRODY, 1997).

Staphylococcus aureus, são cocos Gram-positivos, imóveis, não produtores de esporos, catalase positiva, que tendem a formar agrupamentos irregulares semelhantes a cachos de uva e que podem eventualmente ser encontrados em ambientes hospitalares. São amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas dos mamíferos e aves. São facultativos quanto à respiração e pouco exigentes nutricionalmente. Crescem no Agar Manitol Salgado, e são ativos metabolicamente, fermentando carboidratos e produzindo pigmentos que variam do branco ao amarelo forte (JAWETZ et al., 2000; TORTORA; FUNKE; CASE 2000).

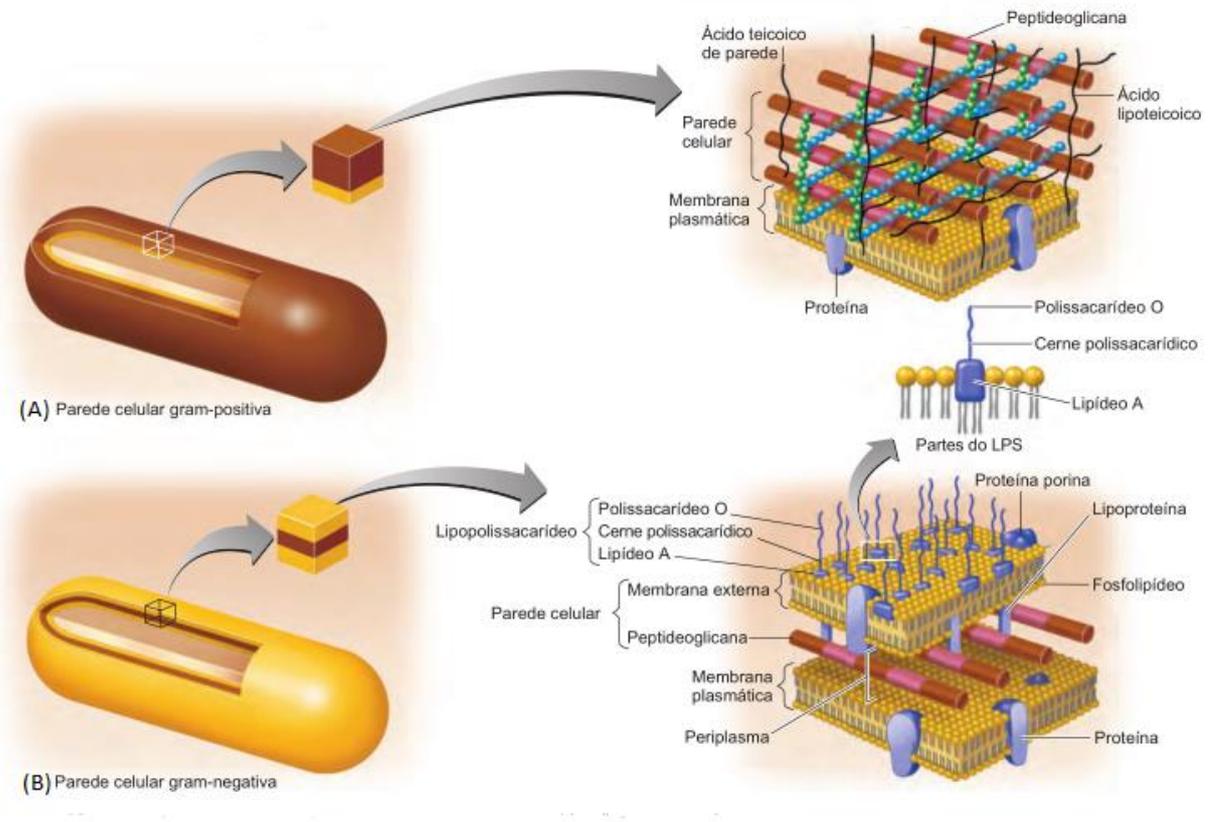
É considerado um patógeno importante para os seres humanos, sendo responsável por diversos processos infecciosos tanto de origem comunitária quanto hospitalar sendo, conseqüentemente, a espécie mais extensivamente estudada (TRABULSI et al., 1999). É o agente causador mais comum de infecções piogênicas. Estas infecções podem se localizar na pele ou em regiões mais profundas do organismo. Quando presentes na pele essas podem causar diversas doenças, diferenciadas pela localização e por outras características. Em indivíduos debilitados, esse microrganismo pode causar infecções de caráter bem mais grave (JAWETZ et al., 2000). Além das infecções piogênicas, o *S. aureus* pode causar vários tipos de intoxicações, seja na vigência de um processo infeccioso ou não (TRABULSI et al., 1999).

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae normalmente encontrada no intestino grosso de seres endotérmicos, tornando-se reconhecida como um comensal inofensivo e um patógeno versátil (VOGT et al., 2005). Espécies causadoras de patologias são genericamente denominadas *Escherichia coli* enterovirulenta, dividindo-se em quatro classes distintas: *E. coli* patogênica (gastroenterites com diarreia aquosae sanguinolenta, predominantemente em crianças com menos de um ano), *E. coli* enterotoxigênica (doença diarreica em indivíduos de todas as idades), *E. coli* enterohemorrágica (enterocolite hemorrágica em indivíduos de todas as idades) e *E. coli* invasora (diarreia sanguinolenta ou não, com presença de leucócitos e muco) (TRABULSI; RACHID, 2004). Diferentes cepas de *E. coli* estão associadas a quadros clínicos de colite hemorrágica, disenteria, cistite, nefrite, infecção de feridas cirúrgicas, septicemia e especialmente da síndrome uremia-hemolítica (GERMANO; GERMANO, 2011).

Pseudomonas aeruginosa, um bacilo Gram-negativo, comumente habita o solo, água, vegetais e ambientes hospitalares (água, equipamentos, utensílios, desinfetantes), e ainda faz parte da microbiota normal do ser humano, sendo encontrada na pele, garganta e fezes de indivíduos saudáveis. Como apresenta poucas exigências para seu crescimento, possui ampla distribuição ambiental (SILVA, 1999; MURRAY et al., 2000; SOUZA et al., 2007). Pode estar frequentemente envolvida em infecções hospitalares, provocando infecções localizadas em decorrência de contaminação oportunista, podendo infectar diversos locais do corpo, como vias urinárias, respiratórias, causar pneumonias, meningites, endocardites além de outros tipos de infecções e, além disso, tem sido relatada em eventos de resistência a antibióticos (DELLEN; IGLEWSKI, 1998).

As bactérias Gram positivas, como *S. aureus*, geralmente são mais sensíveis aos antibióticos que bactérias Gram negativas, como *E. coli* e *P. aeruginosa* (Figura 1), embora alguns antibióticos atuem apenas em bactérias Gram negativas (MADIGAN et al., 2004). O uso de antimicrobianos nas infecções é uma medida muito utilizada. Entretanto, são cada vez maiores os índices de resistência das bactérias frente aos antimicrobianos utilizados nos tratamentos. Devido as bactérias possuírem um curto tempo de geração – minutos ou horas – elas podem responder rapidamente as mudanças do ambiente. Assim, quando os antibióticos são introduzidos no ambiente, as bactérias respondem tornando-se resistentes àquelas drogas. A alta prevalência de infecções justifica a preocupação na busca de recursos que permitam o desenvolvimento de novos métodos de controles específicos para a doença (SILVA JUNIOR, SILVA e CRUZ, 2018).

Figura 1: Diferenças estruturais das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



Fonte: Tortora, Funke e Case (2012)

2.1.2 Doenças parasitárias

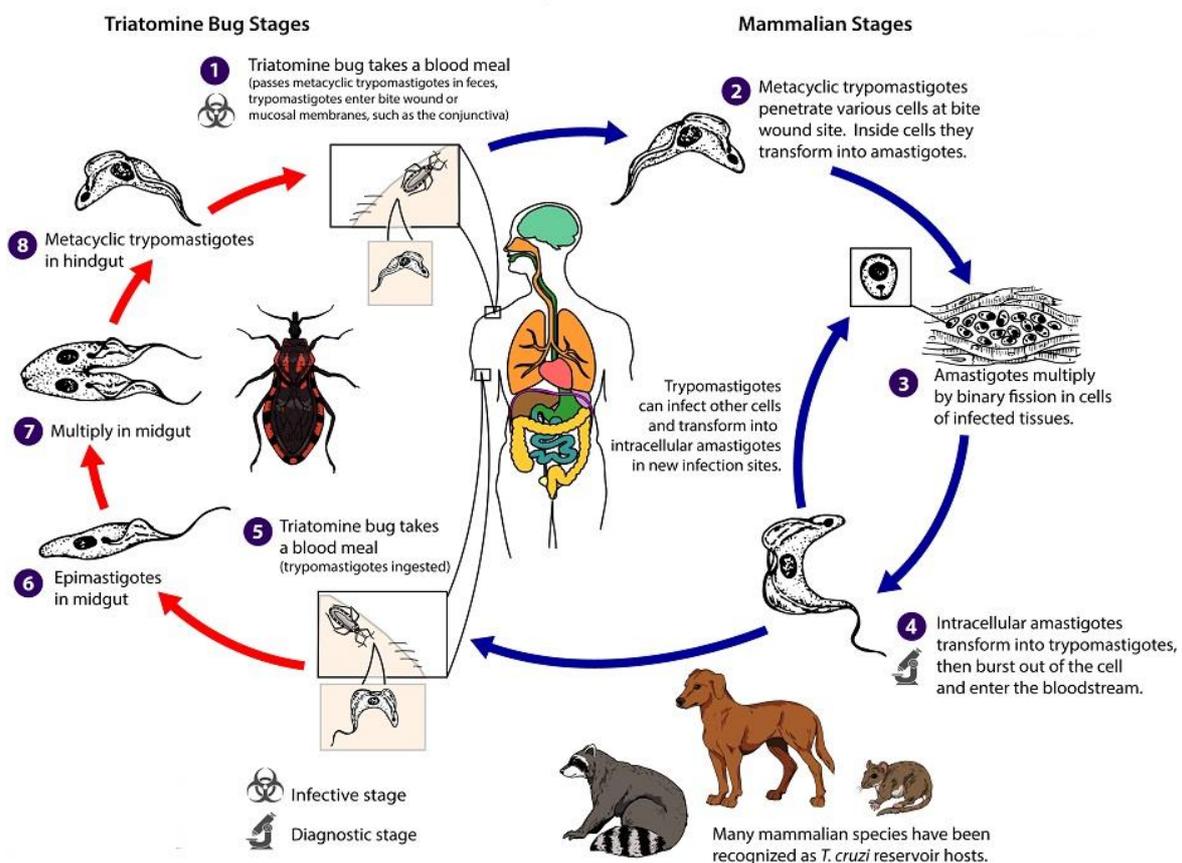
2.1.2.1 Tripanosomíase

A Doença de chagas, também chamada de tripanosomíase americana, tem como agente etiológico o parasita *Trypanosoma cruzi* um protozoário flagelado (CORTEZ et al., 2012). É encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países da América Latina, e acomete cerca de 7 a 8 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2013).

Para se adaptar aos diferentes microambientes interiores de seus hospedeiros, o *T. cruzi* deve sofrer transformações biológicas, que causam alterações estruturais e metabólicas e possibilitam a viabilidade da infecção. O protozoário possui três formas evolutivas: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas. O amastigota é a forma intracelular do *T. cruzi*, encontrado nos tecidos do hospedeiro vertebrado em sua estrutura falta um flagelo exterior. A forma epimastigota

é encontrada no trato digestivo do triatomíneo, assim como nas glândulas anais dos gambás. Apresenta um flagelo livre e intensa atividade replicativa. O tripomastigota não possui capacidade replicativa e corresponde à forma infecciosa extracelular, localizada nos hospedeiros invertebrados e vertebrados como o tripomastigota metacíclico e sanguíneo, respectivamente. O tripomastigota metacíclico é encontrado nas porções finais do intestino ou nos tubos de Malpighi do inseto vetor e apresenta um flagelo mais curto. O tripomastigota sanguíneo é observado no sangue e em outros fluidos corporais - como o fluido cerebrospinal e a linfa - dos hospedeiros vertebrados e o flagelo é longo (MARTINS et al., 2012).

Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: CDC (2019)

A principal forma de transmissão da doença aos seres humanos é pelas fezes do vetor, um inseto triatomíneo hematófago conhecido popularmente como barbeiro (*Triatoma infestans*) (SOBRINHO, 2007), podendo também ser transmitida pela transfusão de sangue, via oral, acidental, congênita e por transplante de órgãos (DIAS et al., 2011). Apresenta-se sob duas formas

uma aguda e uma crônica. A fase aguda é a fase inicial onde um grande número de parasitas circula no sangue, caracterizada por sintomas inespecíficos, dura de 4 a 8 semanas e o tratamento é bem-sucedido (CORTEZ et al., 2012). Já a fase crônica, a fase mais grave, geralmente se apresenta como uma forma indeterminada onde os sintomas apresentados não são importantes clinicamente, podendo ainda apresentar-se nas formas cardíaca e digestiva (OLIVEIRA et al., 2008).

A terapêutica atual para essa doença é bem limitada. O Nifurtimox e o Benznidazol são as drogas mais usadas para o tratamento dessa doença, porém apresentam alta toxicidade e baixa eficiência contra o parasita na fase crônica da doença (OLIVEIRA et al., 2008). Diante da gravidade e grande prevalência dessa doença, bem como da escassez de medicamentos, faz-se necessário à busca de agentes terapêuticos alternativos para essa enfermidade.

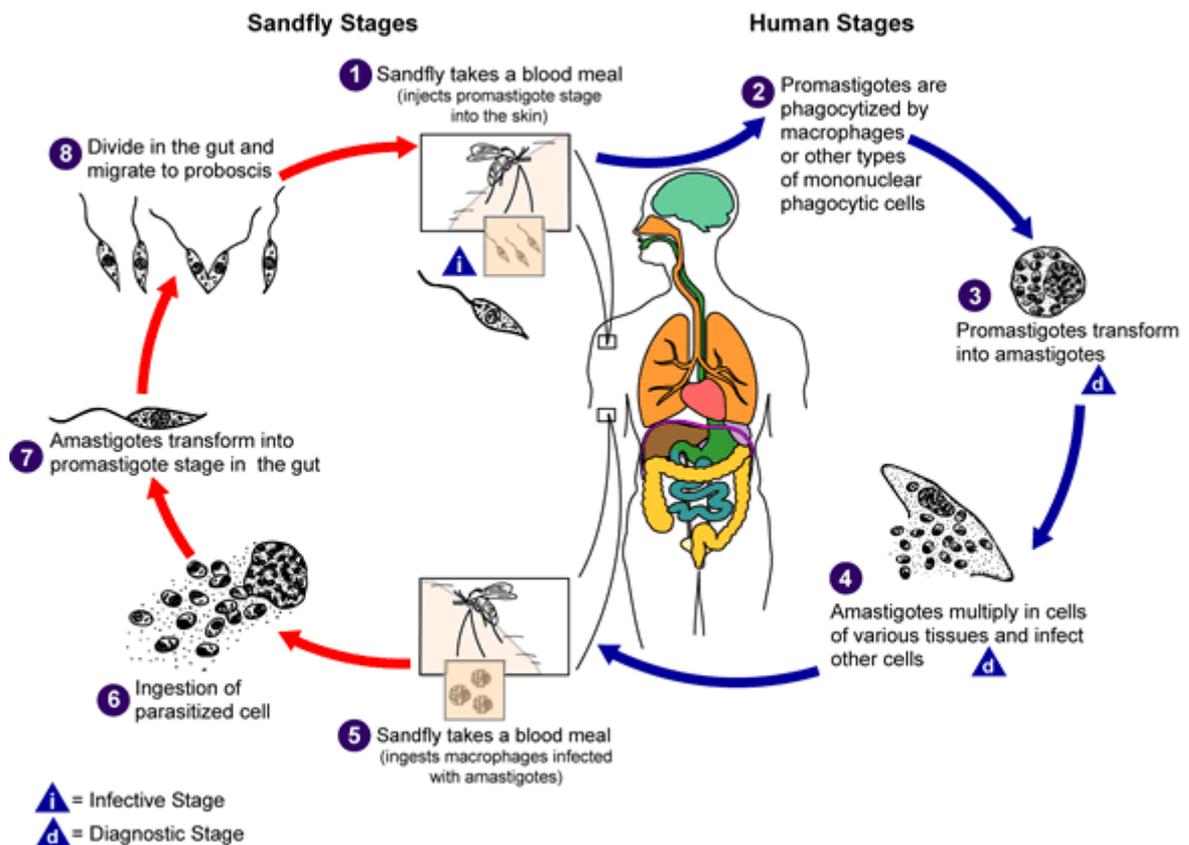
2.1.2.2 Leishmaniose

Os protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* são os agentes causadores da leishmaniose, endêmica em aproximadamente 98 países do mundo e colocando em risco mais de 350 milhões de pessoas (CHATELAIN; IOSET, 2011). Aproximadamente 1,3 milhão de novos casos da doença são relatados anualmente com uma taxa de mortalidade de 30.000 mortes por ano (LACERDA et al., 2016). A leishmaniose é prevalente em todos os continentes, exceto na Antártida e na Oceania e é considerada a terceira doença parasitária mais comum após esquistossomose e malária, com base na morbidade e anos de vida ajustados por incapacidade (BETHONY et al., 2011). Existem 29 espécies do gênero *Leishmania* identificadas com base na caracterização genética e bioquímica (LEWIS, 1971). Dessas 29 espécies, duas espécies: *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (também conhecidas como *Leishmania chagasi*) causam leishmaniose visceral (CHAPPUIS et al., 2007), a forma letal da doença. De acordo com a área geográfica e as manifestações clínicas presentes nos pacientes, a *Leishmania* é classificada como Velho Mundo ou Novo Mundo (LEWIS, 1971).

O parasita existe em duas formas: promastigotas e amastigotas (Figura 3). Os promastigotas são morfologicamente distintos dos amastigotas e são subclassificados em cinco tipos: prócíclico, nectomonado, leptomonado, haptomonado e promastigota metacíclico. Promastigotas metacíclicos são considerados como o estágio infeccioso e têm alta adaptabilidade para transmissão bem-sucedida dentro do hospedeiro humano (KAMHAWI, 2006). Os promastigotas são alongados e possuem um flagelo que é usado para a propulsão do parasita e ligação às microvilosidades no intestino do flebotomíneo. Em contraste, os amastigotas são

arredondados e intracelulares; residindo dentro de macrófagos e outras células fagocíticas mononucleares, por exemplo, células dendríticas (AMBIT et al., 2011), neutrófilos (RITTER et al., 2009) e fibroblastos (BOGDAN et al., 2000).

Figura 3. Ciclo de vida *Leishmania*.



Fonte: CDC (2017)

O modo de transmissão dos parasitas responsáveis pela leishmaniose é através da picada de um flebotomíneo, gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). Com base nas manifestações clínicas exibidas em indivíduos infectados, a leishmaniose pode ser caracterizada nas formas Leishmaniose Visceral (LV), Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (PKDL), Leishmaniose cutânea e Leishmaniose mucocutânea (BRASIL, 2010).

Embora a leishmaniose tenha várias opções de tratamento, a terapia antileishmania tem sido problemática em grande parte devido à complexidade da doença em suas várias formas (TIUMAN et al., 2011). As terapias disponíveis para as várias formas de leishmaniose estão longe do ideal, principalmente por causa da toxicidade extensa, falta de eficácia, parentérica via de

administração que afetam o cumprimento, elevados custos, surgindo resistência à droga e à falta de acesso em áreas regionais. No geral, as opções atuais de tratamento como, por exemplo, antimoniais pentavalentes, pentamidina e anfotericina B são limitadas e são consideradas insatisfatórias, independentemente de qual forma de leishmaniose esteja sendo discutida (ZULTIQR et al., 2017).

2.2 Resistência Microbiana

Desde o século XIX principalmente devido a introdução dos antibióticos na prática clínica houve uma diminuição no número de mortes relacionadas a doenças infecciosas. Esse grupo de fármacos possibilitou o controle dessas doenças bem como favoreceu o aumento da expectativa de vida da população por vários anos. Apesar disso, as doenças infecciosas ainda no século XXI se constituem como uma das mais importantes causas de morte da humanidade (ALÓS, 2015).

Os antibióticos revolucionaram a medicina salvando milhões de vidas. Eles têm contribuído significativamente para o avanço em campos tais como o transplante de órgãos sólidos e progenitores hematopoiéticos, a sobrevivência de (terapias naturais ou de drogas) prematuros e imunossuprimidos, material protético cirurgia e cateteres vasculares, onde as infecções são especialmente prevalentes e importantes (MARSTON et al., 2016).

Entretanto, há alguns anos, a resistência microbiana (RM) aos antibióticos, definida como a capacidade dos microrganismos para sobreviver em concentrações de antibióticos que inibem/matam outros da mesma espécie, representa uma ameaça crescente prejudicando a eficácia destes fármacos (LÓPEZ, 2017).

A RM é um dos maiores problemas enfrentados pela saúde pública em todo o mundo a mesma é produzida pela evolução natural através de mutações genéticas de microrganismos e também, pode ser adquirida como consequência da exposição de microrganismos por um tempo à ação de antibióticos ou outros agentes quimioterápicos. Em sua evolução, os microrganismos desenvolveram múltiplos mecanismos de resistência: inativação do antibiótico, alteração do sítio branco do antibiótico e das barreiras de permeabilidade, produção de enzimas inativadoras, mutação de lugares de ação ou alvos moleculares, superexpressão de bombas de efluxo, etc. (ROJAS; ULATE 2016).

As consequências da RM são agravadas pela estagnação que ocorreu no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Isso é devido a vários fatores: os antibióticos sintéticos não foram capazes de substituir os antibióticos naturais, que são a fonte da maioria dos utilizados na terapia; antibióticos naturais foram isolados por culturas de triagem que contêm diferentes espécies de fungos e bactérias, mas apenas uma pequena porcentagem foi capaz de ser cultivada em laboratórios; a inovação neste domínio tem sido limitada nas últimas décadas porque as empresas farmacêuticas não consideram a busca de novos antibióticos um investimento muito atraente quando comparado a encontrar medicamentos para doenças crônicas, em que um paciente requer a administração de uma medicação ao longo da vida, enquanto uma infecção é resolvida com um ciclo de antibiótico adequado (LÓPEZ, 2017).

Além disso, sabe-se que mutações em microrganismos sensíveis que irá torná-los resistentes ao tratamento, cedo ou tarde começam a aparecer, sendo necessário a constante busca de novos agentes antimicrobianos. O desenvolvimento de antibióticos para infecções por bactérias gram-negativas é particularmente difícil devido à baixa permeabilidade da sua parede celular, a variedade de bombas de efluxo disponíveis, e uma série de enzimas capazes de inativar; o registro de um paciente em ensaios clínicos de novos candidatos para superar infecções resistentes pode ser complicada pela incidência de infecções esporádicas e a probabilidade de que o referido paciente é exposto a outros antibióticos no hospital; o número de alvos reconhecidos pelos antibióticos disponíveis é muito baixo (LÓPEZ, 2017).

Diante de um cenário de incertezas e com poucas perspectivas, em que o efeito da resistência antimicrobiana ameaça voltar a humanidade à era pré-antibiótica, alguns países têm se dedicado na busca de estratégias a fim de controlar a resistência antimicrobiana. Os principais objetivos dessas estratégias são atrasar ou impedir o surgimento e disseminação de bactérias resistentes através do monitoramento da resistência antimicrobiana, vigilância do uso de antimicrobianos, regulação e controle da venda, promoção do uso responsável e prevenção e controle de infecções em hospitais e estabelecimentos agropecuários (SILVA; SILVA JUNIOR 2015; LAZOVSKI et al., 2017).

Também, a busca de substâncias capazes de preservar os antibióticos existentes através da potencialização ou reversão dos efeitos tem se constituído de uma estratégia promissora no controle da resistência antimicrobiana. Os modificadores da ação de antibióticos são compostos com pouca ou nenhuma atividade antibiótica que aumentam a atividade desses fármacos, bloqueando a resistência ou aumentando a resposta do hospedeiro à infecção (WRIGHT, 2016).

2.3 Prospecção de Produtos Naturais

O Brasil por ser o país com uma grande biodiversidade é objeto de interesse e debate global significativo em relação ao desmatamento e à proteção ambiental. No entanto, muito do potencial de suas espécies vegetais ainda é desconhecido. Uma estratégia para contribuir para a conservação de espécies valiosas para a solução de problemas de saúde humana é fornecer conhecimento para o despertar de ações públicas visando proteger esse arsenal de espécies vegetais que, além de seu papel nos ecossistemas naturais, também podem contribuir para prevenir e tratar doenças crônicas (PESSOA et al., 2016).

Plantas medicinais são caracterizadas como plantas que administradas ao homem ou animal, por qualquer via ou forma, exerçam alguma ação terapêutica. Historicamente, as plantas têm sido utilizadas pelas diversas culturas para o tratamento das mais variadas enfermidades e, até hoje, quando as desigualdades socioeconômicas promovem uma distribuição desigual de renda e acesso restrito a bens e serviços de assistência à saúde, o uso da medicina tradicional pode se constituir como único recurso racional disponível para várias comunidades (MADEIRO; LIMA, 2015).

O uso de plantas medicinais deve estar baseado em conhecimento científico que comprove a eficácia e segurança, e respaldado em políticas públicas adequadas. Com a finalidade de evitar o uso inadequado desta prática medicinal, no Brasil, o Ministério da Saúde buscou estimular a inserção da fitoterapia, entre outras práticas, no Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2012).

Nesse contexto diversos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de validar as propriedades farmacológicas de diversas espécies de plantas tradicionalmente utilizadas para o tratamento de várias doenças, sendo que a maioria desses estudos têm se concentrado em tratamentos terapêuticos e preventivos para o câncer, doenças infecciosas, doenças do sistema nervoso central (Alzheimer e Parkinson), doenças inflamatórias, antibacterianas, antivirais, (antiasmáticos e antipsoríase), cardíacas, anti-hipertensivas e antidiabéticas (CARNEIRO et al., 2014).

Grande parte desses estudos utiliza extratos e óleos vegetais nas bioprospecção farmacológica de novos antimicrobianos com alto potencial anti-infeccioso (VUUREN; HOLL, 2017).

2.4 Família Chrysobalanaceae e Gênero *Licania*

Chrysobalanaceae é uma família de plantas lenhosas com distribuição pantropical de espécies, sendo que a maior diversidade se encontra nas regiões neotropicais, provavelmente devido uma maior taxa de especiação nessas regiões (BARDON et al., 2013). Esta família se diversificou a partir da transição Eoceno-Oligoceno. Uma reconstrução de área ancestral confirma uma origem Paleotropical, com vários eventos de dispersão transoceânica. O principal clado neotropical provavelmente resultou de um único evento migratório na África, em torno de 28 mil anos atrás, que subsequentemente sofreu rápida diversificação (BARDON et al., 2016; JUD; NELSON; HERRERA 2016).

É composta por aproximadamente 525 espécies distribuídas em 17 gêneros que são alocados em quatro tribos: Chrysobalanaceae, Couepieae, Parinariaceae e Hirtelleae (PRANCE; WHITE, 1988).

A Chrysobalanaceae possui folhas inteiras, duras, providas de alternas, distícuas, com estípulas. Suas flores são pequenas e geralmente branco-esverdeadas, cíclicas, zigomórficas, diclamidas, com um receptáculo desenvolvido, sem sépalas e pétalas, pentâmeros gerais e o crômio consiste em dois estames para muitos livres ou mais ou menos soldados; ovário superomedial, bi ou tricarpelar, unilocular, geralmente com apenas um óvulo e frutas geralmente drupáceas (CORRÊA; SCUDELLER; ARAÚJO, 2015; FEITOSA; XAVIER; RANDAU, 2012).

Existem poucos estudos, tanto fitoquímicos quanto farmacológicos, que expressam o potencial terapêutico dessas espécies. Quanto a composição química a maioria dos estudos sobre compostos foram realizados com espécies dos gêneros *Licania* e *Parinari*. Dentre as principais classes de constituintes químicos relatados para esta família estão os triterpenóides, os diterpenos, os esteróides e os fenilpropanóides, como os flavonóides e os derivados cromona (CARNEVALE NETO et al., 2013).

As espécies de Chrysobalanaceae têm indicações na medicina tradicional e tratamentos para várias doenças, como malária, epilepsia, diarreia, sangramento, doenças venéreas e diabetes (FEITOSA; XAVIER; RANDAU, 2012). O óleo de *Atuna racemosa* extraído da fruta é amplamente utilizado em Samoa como anti-inflamatório para massagem (PRANCE, 2004).

Estudos visando à confirmação das propriedades farmacológicas de algumas espécies de Chrysobalanaceae descreveram atividade moluscicida (BILIA et al., 2000); antitumoral (FERNANDES et al., 2003); antioxidante, antiplasmodial e antileishmanial *in vitro*, antitripanossomal (ATTIOUA et al., 2012; SAWADOGO et al., 2012) analgésica (ARAUJO-FILHO et al., 2016); potencial hepatoprotetor (OLALEYE et al., 2014); propriedade antihiperlipidêmica (WHITE et al., 2016).

Licania compreende um gênero com 220 espécies, e atualmente dividido em quatro subgêneros: *Licania*, *Moquilea*, *Parinariopsis* e *Angelesia*. Todos os subgêneros compartilham os caracteres de um ovário unilocular inserido na ou perto da base do receptáculo, e um receptáculo essencialmente actinomórfico (SOTHERS; PRANCE, 2014).

Corresponde a um dos maiores gêneros amazônicos em termos de plantas de sementes e espécies arbóreas (CARDOSO et al., 2017). Atualmente é o gênero mais rico em espécies de Chrysobalanaceae. Está confinado aos neotrópicos, e é altamente polifilético em análises filogenéticas moleculares. *Licania*, redefinida com 100 espécies, é então o segundo maior gênero da família após *Hirtella* (107 espécies) (SOTHERS; PRANCE; CHASE, 2016).

Estudos fitoquímicos com o gênero *Licania* levaram ao isolamento e caracterização estrutural, de muitos metabólitos secundários, principalmente flavonóides e, especialmente, glicosídeos de flavonóis, diterpenos de clerodano e triterpenos com os esqueletos de lupano, ursano e oleanano. Particularmente os flavonóides e seus glicosídeos têm interesse quimiotaxonômico no gênero e, em geral, na família Chrysobalanaceae (BRACA et al., 2003; CASTILHO et al., 2005).

Neste contexto, vários estudos biológicos foram realizados em alguns extratos brutos dessas plantas. São citotóxicas para células cultivadas de hepatoma humano (HepG2), carcinoma do cólon (Caco-2), melanoma B16 e CA-9KB. Além disso, uma atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* também foi demonstrada (BILIA et al., 2000). O extrato de semente de *Licania tomentosa* apresentou atividade anti *Herpes simplex* (MIRANDA et al., 2002). Triterpenos puros mostraram atividade antibacteriana em Gram positivos e leveduras e moderada ação citotóxica contra o ensaio de KB, enquanto que os diterpenos apresentaram propriedades antifúngicas. Os flavonóides também foram testados por sua ação antioxidante como removedores de radicais livres (BRACA et al., 2003).

2.5 *Licania rigida* (oiticica)

A espécie *Licania rígida* popularmente conhecida como oiticica. É uma árvore lenhosa, pertencente ao gênero *Licania*, da família Chrysobalanaceae. Ocorre entre os Estados do Piauí e Pernambuco, principalmente no sertão, em aluviões marginais dos rios, em altitude de 50 até 300m e com cerca de 3.000 horas de luz solar por ano. Trata-se de uma planta xerófita de grande porte, atingindo, às vezes, até 15m de altura, de vida longa e folhas perenes. As flores da *Licania rigida* são pequenas, hermafroditas, amarelas internamente, de 2 a 3mm de diâmetro, agrupam-se às centenas na inflorescência e são muito visitadas por insetos. A abertura das flores coincide com a época mais seca do ano ocorrendo nos meses de junho até outubro e permanecendo contínua durante quase 100 dias, desde a primeira até a derradeira flor. A *Licania rigida* em ambiente natural não produz frutos todos os anos (DUQUE, 2004).

De novembro até janeiro-fevereiro, os frutos se completam, amadurecem e caem. Possuem peso médio de 9 gramas, apresentam alto teor de óleos e são formado por uma cápsula, composta de três camadas: exocarpo, cuja casca é verde quando maduro e torna-se amarelo-escuro quando amadurece e seca; mesocarpo, porção mediana, sucosa por ser rica em água, e endocarpo

apresentando-se como uma massa amarelada, rala e fibrosa, ambas com função de revestir e proteger a semente (ALMEIDA et al., 2015).

A semente de *Licania rigida* é eurispérmica, apresenta comprimento de 3,1 a 5,0 cm, largura de 1,3 a 1,7 cm e espessura de 1,2 a 1,7 cm. É caracterizada por uma coloração marrom semelhante à madeira, composta por uma casca revestindo a amêndoa. As sementes de *Licania rigida* são fotoblasticas neutras e a germinação é bem-sucedida na faixa de temperatura entre 20 a 30 °C (DINIZ et al., 2008). O embrião é grande, de formato linear, com cotilédones carnosos de cor branca amarelada, dobrados e apresentam nervuras e o eixo hipocótilo-radícula curto. Germinação inicia-se aos 15 dias, sendo hipógea criptocotiledonar. A plântula possui nas faces dos primórdios foliares, uma camada esbranquiçada com aspecto cotonoso (ALMEIDA et al., 2015; DINIZ et al., 2015).

O tempo de armazenamento influencia a composição química e mineral das amêndoas de *Licania rigida* de modo que o teor de óleo nas amêndoas diminui à medida que avança o tempo de armazenamento e os componentes minerais: magnésio, potássio e fosforo apresentaram os maiores valores num período maior de armazenamento e, nitrogênio, cálcio e enxofre apresentam-se em níveis mais elevados na colheita mais recente (QUEIROGA et al., 2013).

Quanto à composição química do óleo de *Licania rigida* uma característica importante é que este é composto basicamente pelos ácidos licânico (70 a 80%), linolênico (10 a 12%) com pequenas quantidades de ácido oléico, palmítico e esteárico, ganha destaque no mercado industrial pela sua alta secatividade na qual é utilizado na fabricação de tintas para automóveis, tintas para impressoras e vernizes, podendo ser utilizado também para a produção de biopolímeros com utilização em diversas áreas como a farmacêutica e química fina (OLIVEIRA et al., 2012).

Estudos etnobotânicos mostraram que diversas partes da *Licania rigida* (folhas, frutos, madeira) são utilizadas pela população para diversas finalidades: construção de casas, forragem, combustível, usos tecnológicos e medicinais. Na medicina tradicional o decocto das folhas é empregado para diabetes (AGRA et al., 2007).

Há poucos estudos que buscam validar o potencial farmacológico de *L. rigida*. É relatada como uma promissora semente oleaginosa a ser aplicada como base para o biodiesel por possuir significativa estabilidade térmica (MACEDO et al., 2011); o extrato hidroalcolólico da casca apresenta bioatividade inseticida como repelente contra *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (PESSOA et al., 2015); além de serem relatadas como promissoras para atividades antioxidante e citotóxica (PESSOA et al., 2016).

Desse modo, este trabalho visa expandir os estudos sobre a espécie, conhecer suas características terapêuticas e/ou tóxicas, para se apresentar uma informação segura à população

sobre suas propriedades e efeitos farmacológicos. Além disso, investigar os efeitos antiparasitários e antibacterianos do extrato hidroalcoólico e etanólico das folhas de *Licania rigida*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Validar as atividades antibacteriana, modificadora da atividade de antibióticos, antiparasitária e citotóxica dos extratos hidroalcoólico e etanólico das folhas de *Licania rigida* Benth.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar os componentes químicos presentes nos extratos hidroalcoólico e etanólico das folhas de *Licania rigida*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos hidroalcoólico e etanólico das folhas de *Licania rigida*;
- Avaliar a atividade modificadora dos antibióticos dos extratos hidroalcoólico e etanólico das folhas de *Licania rigida*;
- Avaliar a atividade tripanocida dos extratos hidroalcoólico e etanólico das folhas de *Licania rigida* através de ensaios *in vitro* com a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*;
- Analisar o efeito leishmanicida dos extratos hidroalcoólico e etanólico das folhas de *Licania rígida in vitro* frente às cepas promastigotas de *Leishmania infantum* *Leishmania brasiliensis*;
- Identificar a citotoxicidade dos extratos hidroalcoólico e etanólico das folhas de *Licania rigida in vitro* frente à cultura de células de mamíferos.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; BASÍLIO, I.J.D.; NURITI, K.; COELHO, V.P.; BARBOSA, D.A. Sinopse da Flora Medicinal do Cariri Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 3, p. 323-330, 2007.
- ALMEIDA, M. S. C; MENDONÇA, R. DE L; FREITAS, M. Z. C.; VANDESMET, L. C. S. **Anais da Mostra de Biomedicina da Unicatólica** v.1. n.1. 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/123456789/704>
- ALMEIDA, T.S.S.; ARAÚJO, A.S.; ALVES, G.S.; MARQUE, A.E.F.; ALBUQUERQUE, T.N. Biometria, caracterização física e rendimento lipídico do fruto de *Licania rigida* Benth. adquiridos no município de Pombal-PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 4, p. 55-58, 2015.
- ALÓS, J.I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 10, p. 692-699, 2015.
- AMBIT, A.; WOODS, K.L.; CULL, B.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. Morphological events during the cell cycle of *Leishmania major*. **Pharmaceutical Biology**, v. 10, n. 11, p. 1429-1438, 2011.
- ARAÚJO-FILHO, H.G.; DIAS, J.D.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; SANTOS, M.R.V.; WHITE, P.A.S.; BARRETO, R.S.S.; BARRETO, A.S.; ESTEVAM, C.S.; ARAUJO, S.S.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M.; QUINTANS, J.S.S. Phytochemical screening and analgesic profile of the lyophilized aqueous extract obtained from *Chrysobalanus icaco* leaves in experimental protocols. **Plos One**, v. 54, n. 12, p. 3055-3062, 2016.
- ASTOLFI FILHO, S.; SILVA, C.G.N.; BIGI, M.F.M.A. Bioprospecção e biotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, v. 19, n. 38, p. 45-80, 2014.
- ATTIOUA, B.; YEO, D.; LAGNIKA, L.; HARISOLO, R.; ANTHEAUME, C.; WENIGER, B.; KAISER, M.; LOBSTEIN, A.; VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C. In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of a new ventiloquinone and five known triterpenes from *Parinari excelsa*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 7, p. 801-806, 2012.
- BARDON, L.; CHAMAGNE, J.; DEXTER, K.G.; SOTHERS, C.A.; PRANCE, G.T.; CHAVE, J. Origin and evolution of Chrysobalanaceae: insights in to the evolution of plants in the Neotropics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 171, n. 19-37, 2013.
- BARDON, L.; SOTHERS, C.; PRANCE, G.H.T.; MALÉ, P.J.G.; XI, Z.; DAVIS, C.C.; MURIENNE, J.; GARCÍA-VILLACORTA, R.; COISSAC, E.; LAVERGNE, S.; CHAVE,

J. Unraveling the biogeographical history of Chrysobalanaceae from plastid genomes. **American Journal of Botany**, v. 103, n. 6, p. 1-14, 2016.

BETHONY, J.M.; COLE, R.N.; GUO, X.; KAMHAWI, S.; LIGHTOWLERS, M.W.; LOUKAS, A.; PETRI, W.; REED, S.; VALENZUELA, J.G.; HOTEZ, P.J. Vaccines to combat the neglected tropical diseases. **Immunological Reviews**, v. 239, n. 1, p. 237-270, 2011.

BILIA, A.R.; BRACA, A.; MENDEZ, J.; MOREHI, I. Molluscicidal and piscicidal activities of venezuelan Chrysobalanaceae plants. **Plant Toxicity on Snails and Fish**, v. 66, n. 4, p. 30-37, 2000.

BOGDAN, C.; DONHAUSER, N.; DÖRING, R.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A.; RITTIG, M.G. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 12, p. 2121-2129, 2000.

BRACA, A.; BILIA, A.R.; MENDEZ, J.; PIZZA, C.; MORELLI, I.; TOMMASI, N. Chemical and biological studies on *Licania* genus. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 28, p. 40-47, 2003.

BRAOIOS, A.; FERREIRA TURATTI, T.; SAAB MEREDIJA, L. C.; SANCHEZ CAMPOS, T. R.; MEDEIROS DENADAI, F. H. Infecções do trato urinário em pacientes não hospitalizados: etiologia e padrão de resistência aos antimicrobianos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 45, n. 6, p. 449-456, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica; n. 31).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso/Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 8. ed. rev. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CARDOSO, D.; SÄRKINEN, T.; ALEXANDER, S.; AMORIM, A.M.; BITTRICHE, V.; CELISF, M.; DALYH, D.C.; FIASCHI, P.; FUNK, V.A.; GIACOMINI, L.L.; GOLDENBERG, R.; HEIDENL, G.; IGANCIM, J.; KELLOFF, C.L.; KNAPP, S.; LIMA, H.C.; MACHADO ANDERSON, F.P.; SANTOS, R.M.; MELLO-SILVA, R.; MICHELANGELO, F.A.; MOONLIGHT, J.M.P.; MORAES, P.L.R.; MORIH, S.A.; NUNES,

T.S.; PENNINGTONT, T.D.; PIRANIR, J.R.; PRANCET, G.T.; QUEIROZ, L.P.; RAPINIP, A.; RIINAU, R.; RINCONV, C.A.V.; ROQUEA, N.; SHIMIZUW, G.; SOBRAL, M.; STEHMANNY, J.R.; STEVENSZ, W.D.; TAYLORZ, C.M.; TROVÓA, M.; BERGP, C.V.D.; WERFFZ, H.D.; VIANAB, P.L.; ZARTMANC, C.E.; FORZZAO, R.C. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. **PNAS**, v. 114, n. 40, p. 10695-10700, 2017.

CARNEIRO, F.M.; SILVA, M.J.P.; BORGES, L.L.; ALBERNAZ, L.C.; COSTA, J.D.P. Tendências dos Estudos com Plantas Mediciniais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais – UEG/Câmpus de Iporá**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CASTILHO, R.O.; OLIVEIRA, R.R.; KAPLAN, M.A.C. Licanolide, a new triterpene lactone from *Licania tomentosa*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 60, p. 562-566, 2005.

CARNEVALE NETO, F.; PILON, A.C.; BOLZANI, V.S.; CASTRO-GAMBOA, I. Chrysobalanaceae: secondary metabolites, ethnopharmacology and pharmacological potential. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, p. 121-146, 2013.

CARVALHO, E.A.B.; ANDRADE, P.P.; SILVA, N.H.; PEREIRA, E.C.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Effect of usnic acid from the lichen *cladonia substellata* on *trypanosoma cruzi* *in vitro*: an Ultrastructural Study. **Micron**, v. 36, p. 155-161, 2005.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 22-30, 2007.

CHATELAIN, E.; IOSET, J.R. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 5, n. 175, p. 7-25, 2011.

CORRÊA, M.M.; SCUDELLER, V.V.; ARAÚJO, M.G.P. Comparative leaf morphological analysis of 20 species of Chrysobalanaceae. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 1, p. 13-20, 2015.

CORTEZ, J.; RAMOS, E.; VALENTE, C.; SEIXAS, J.; VIEIRA, A.A. Expressão Global da Doença de Chagas – Oportunidades Emergentes e Impacto em Portugal. **Acta Medica Portuguesa**, v. 25, n. 5, p. 332-339, 2012.

DELLEN, C.V.; IGLE WSKI, B.H. Cell to Cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 70-79, 1998.

DIAS, J.C.P.; NETO, V.A.; LUNA, E.J.A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 375-379, 2011.

DINIZ, F.O.; MEDEIROS-FILHO, S.; BEZERRA, A.M.E.; MOREIRA, F.J.C. Biometria e morfologia da semente e plântula de oiticica. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 2, p. 183-187, 2015.

DINIZ, F.O.; MOREIRA, F.J.C.; SILVA, F.D.B.; MEDEIROS FILHO, S. Influência da luz e temperatura na germinação de sementes de oiticica (*Licania rigida*, Benth). **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 3, p. 476-480, 2008.

DUQUE, J.G. **O Nordeste e as lavouras xerófilas**. Banco do Nordeste do Brasil, 4ª ed. 2004.

FEITOSA, E.V.; XAVIER, H.S.; RANDAU, K.P. Chrysobalanaceae: traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 303-312, 2012.

FERNANDES, J.; CASTILHO, R.O.; COSTA, M.R.; WAGNER-SOUZA, K.; KAPLANB, M.A.C.; GATTASS, C.R. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. **Cancer Letters**, v. 190, p. 165-169, 2003.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de alimentos**. 4ª ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2011.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. V. 7, n. 3, p. 338- 349, 2004.

GUIDO, R.V.C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 37-46, 2008.

JAWETZ, E.; MELNICK, L.; ADELBERG, A.; BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. **Microbiologia Médica**. 21ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

JUD, N.A.; NELSON, C.W.; HERRERA, F. Fruits and wood of Parinari from the early Miocene of Panama and the fossil record of Chrysobalanaceae. **American journal of Botany**, v. 103, n. 2, p. 1-13, 2016.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

LACERDA, A.F.; PELEGRINI, P.B.; OLIVEIRA, D.M., VASCONCELO, E.A.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Anti-parasitic peptides from arthropods and their application in drug therapy. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 91, p.1-16, 2016.

LANA, M.; TAFURI, W.L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. (editores). **Parasitologia Humana**. 11ª ed. São Paulo: Atheneu, p. 85-108, 2005.

LAZOVSKI, J.; CORSO, A.; PASTERAN, F.; MONSALVO, M.; FRENKEL, J.; CORNISTEIN, W.; CORRAL, G.; NACINOVICH, F. Estrategia de control de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Argentina. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 41, n. 88, 2017.

LEWIS, D.J. Phlebotomid sandflies. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 44, n. 4, p. 535, 1971.

LÓPEZ, C.T.C.; ÁLVAREZ, M.A.D.; MORALES, M.A.R.; MORALES, J.R.Z.; MACÍAS, C.L.M. Evaluación y Caracterización de Cepas Bacterianas con Resistencia a Múltiples Drogas Provenientes de Aislados Clínicos en Ambientes Hospitalarios. **Verano de la Investigación Científica**, v. 3, n. 2, p. 198-202, 2017.

LÓPEZ, M.A. Antimicrobial resistance. Some aspects of a big problem. **Anales De La Real Academia Nacional De Farmacia**, v. 83, n. 4, 380-391, 2017.

MACEDO, F.L.; CANDEIA, R.A.; SALES, L.L.M.; DANTAS, M.B.; SOUZA, A.G.; CONCEIÇÃO, M.M. Thermal characterization of oil and biodiesel from oiticica (*Licania rigida* Benth). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p. 531-534, 2011.

MADEIRO, A.A.S.; LIMA, C.R. Estudos etnofarmacológicos de plantas medicinais utilizadas no Brasil: revisão de literatura. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 3, n. 1, p. 69-76, 2015.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10ª ed. São Paulo: Pearson; Prentice Hall, 2004.

MARSTON, H.D.; DIXON, D.M.; KNISELY, M.; PALMORE, T.N.; FAUCI, A.S. Resistência antimicrobiana. **Arsenal Terapêutico**, v. 316, n. 11. 2016. Disponível em: <<http://www.arsenalterapeutico.com/2016/11/02/resistencia-antimicrobiana/>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

MARTINS, A.V.; GOMES, A.P.; MENDONÇA, E.G.; FIETO, J.L.R.; SANTANA, L.A.; OLIVEIRA, M.G.A.; GELLER, M.; SANTOS, R.F.; VITORINO, R.R.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. **Infectio**, v. 16, n. 1, p. 45-58, 2012.

MIRANDA, M.M.F.S.; GONÇALVES, J.L.S.; ROMANOS, M.T.V.; SILVA, F.P.; PINTO, L.; SILVA, M.H.; EJZEMBERG, R.; GRANJA, L.F.Z.; WIGG, M.D. Anti-herpes simplex virus effect of a seed extract from the tropical plant *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch (Chrysobalanaceae). **Phytomedicine**, v. 9, p. 641-645, 2002.

MURRAY, P.R.; PATRICK, R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

NEVES, V.; SILVA, L. As Leishmanioses, Uma Visão Para o Clínico. **Revista Prática Hospitalar**. V.4, n. 36, p. 45-49, 2004.

OLALEYE, M.T.; AMOBONYE, A.E.; KOMOLAFE, K.; AKINMOLADUN, A.C. Protective effects of *Parinari curatellifolia* flavonoids against acetaminophen-induced hepatic necrosis in rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 486-492, 2014.

OLIVEIRA, M.F.; DIAS, A.T.N.; PONTES, V.M.O.; JÚNIOR, A.S.S.; COELHO, H.L.L.; COELHO, I.C.B. Tratamento Etiológico da Doença de Chagas no Brasil. **Revista Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.

OLIVEIRA, F.A.G.; PINTO, V.L.; SOUZA, L.D.; DINIZ, J.C.; SANTOS, A.G.D.; VIANNA, F.A. Síntese, caracterização e avaliação de biodiesel de óleo de oiticica (*Licania rigida* Benth) e isolamento do éster metílico do ácido licânico. **Química: ciência, tecnologia e sociedade**, v. 1, n. 1, p. 7-22, 2012.

PANDA, S.K.; DASB, R.; LEYSSEND, P.; NEYTSD, J.; LUYTEN, W. Assessing medicinal plants traditionally used in the Chirang Reserve Forest, Northeast India for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 225, p. 220-233. 2018.

OLIVEIRA, P. G. F. **Caracterização de Pseudomonas spp. isolados de pacientes, profissionais da saúde e ambiente hospitalar**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/193679>

PEREIRA, V.F.; BENASSI, J.C.; STARKE-BUZETTI, W.A.; SILVA, D.T.; FERREIRA, H.L.; KEIDE, L.B.; SOARES, R.M.; RUIZ, V.L.A.; OLIVEIRA, T.M.F.S. Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival sawb PCR. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 104-106, 2016.

PESSOA, E.B.; ALMEIDA, F.A.C.; SILVA, L.M.M. Bioatividade de três extratos de plantas no controle do *Zabrotes subfasciatus* (Boh.). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 4, p. 465-477, 2015.

PESSOA, I.P.; LOPES-NETO, J.J.; ALMEIDA, T.S.; FARIAS, D.F.; VIEIRA, L.R.; MEDEIROS, J.L.; BOLIGON, A.A.; PEIJNENBURG, A.D.; CASTELAR, I.; CARVALHO,

A.F.U. Polyphenol Composition, Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Seeds from Two Underexploited Wild *Licania* Species: *L. rigida* and *L. tomentosa*. **Molecules**, v. 21, p. 1746-1755, 2016.

PIERCE, R.J.; MACDOUGALL, J.; LEURS, R.O.B.; COSTI, M.P. The Future of Drug Development for Neglected Tropical Diseases: How the European Commission Can Continue to Make a Difference. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 8, p. 581-583, 2017.

PRANCE, G.T. The uses of *Atuna racemosa* Raf. (Chrysobalanaceae) in Samoa. **Economic Botany**, v. 58, n. 3, p. 470-475. 2004.

PRANCE, G.T.; WHITE, F. The genera of Chrysobalanaceae: A study in practical and theoretical taxonomy and its relevance to evolutionary biology. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 320, p. 1-184, 1988.

QUEIROGA, V.P.; FREIRE, R.M.M.; MARINHO, D.R.F.; ALMEIDA, F.A.C.; MELO, B.A. Composição química e mineral de amêndoas de oiticica em três tempos de armazenamento. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró – RN - Brasil, v. 8, n. 2, p. 173-177, 2013.

RASTOGI, S.; PANDEY, M.M.; RAWAT, A.K.S. Ethnopharmacological uses, phytochemistry and pharmacology of genus *Adiantum*: A comprehensive review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.215, p. 101-119, 2018.

RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 11, p. 505-510, 2009.

ROJAS, G.C.; ULATE, L.A. Resistência Antimicrobiana: Microrganismos más resistentes y antibióticos com menor actividad. **Revista Medica de Costa Rica y Centroamerica**, v. 73, n. 621, p. 757-763, 2016.

SAWADOGO, W.R.; DOUARON, G.L.E.; MACIUK, A.; BORIES, C.; LOISEAU, P.M.; FIGADÈRE, B.; GUISSOU, I.P.; NACOUUMA, O.G. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of five medicinal plants from Burkina Faso. **Parasitology Research**, v. 110, p. 1779-1783. 2011.

SEHN, L. G.; ZANON, G. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DA TRIPANOSSOMÍASE AMERICANA. In: **6º Congresso Internacional em Saúde**. 2019.

SILVA, C.H.P.M. **Bacteriologia: um texto ilustrado**. Teresópolis, RJ, Eventos, p. 121-134, 1999.

SILVA, C.D.R.; SILVA-JÚNIOR, M. Estratégias para uso adequado de antibioticoterapia em unidade de terapia intensiva. **Einstein**, v. 13, p. 448-453, 2015.

SILVA JÚNIOR, V. B.; SILVA, M. T. A.; CRUZ, D. F. Interface entre as Doenças Infecciosas e Parasitárias e a Estratégia Saúde da Família no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. Vol. 24, N. 4, P. 325-332, 2018.

SOBRINHO, J.L.S.; MEDEIROS, F.P.; LA ROCA, M.F.; SILVA, K.E.R.; LIMA, L.N.A.; NETO, P.J.R. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de chagas. **Revista Patologia Tropical**, v. 36, n. 2, p. 103-118, 2007.

SOTHERS, C.A.; PRANCE, G.T.; CHASE, M.W. Towards a monophyletic *Licania*: a new generic classification of the polyphyletic Neotropical genus *Licania* (Chrysobalanaceae). **Kew Bulletin**, v. 71, n. 58, 2016.

SOTHERS, C.A.; PRANCE, G.T. Resurrection of *Angelesia*, a Southeast Asian genus of Chrysobalanaceae C.A. **Blumea**, v. 59, p. 103-105, 2014.

SOUZA, O.C.; SOBRINHO, J.L.S.; MEDEIROS, F.P. Antimicrobial resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in feces of patients infected with human immunodeficiency vírus. **Caderno Saúde Coletiva**, v. 15, n. 3, p. 392-379, 2007.

TIUMAN, T.S.; SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 525-532, 2011.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. - **Microbiologia**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TRABULSI, L.R.; RACHID, L. **Microbiologia**. 4ª ed, São Paulo: Atheneu, 2004.

TRABULSI, R.; ALTERTHUM GOMPERTZ, F.; CANDEIAS, N. **Microbiologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, p.149-153, 1999.

TUASHA, N.; PETROS, B.; ASFAW, Z. Medicinal plants used by traditional healers to treat malignancies and other human ailments in Dalle District, Sidama Zone, Ethiopia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 14, n. 15, p. 1-6, 2018.

VOGT, B. Urate oxidase (rasburicase) for treatment of severe tophaceous gout. **Nefrology, Dialysis, Transplantation**, v. 20, n. 2, p. 431-433, 2005.

VUUREN, S.; VAN HOLL, D. Antimicrobial natural product research: A review from a South African perspective for the years 2009-2016. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 208, p. 236-252, 2017.

WHITE, P.A.S.; ARAUJO, J.M.D.; CERCATO, L.M.; SOUZA, L.A.; BARBOSA, A.P.O.; QUINTANS-JUNIOR, L.J.; MACHADO, U.F.; CAMARGO, E.A.; BRITO, L.C.; SANTOS, M.R.V. *Chrysobalanus icaco* L. Leaves Normalizes Insulin Sensitivity and Blood Glucose and Inhibits Weight Gain in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 19, n. 2, p. 155-160, 2016.

WHO (World Health Organization). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Organ fact sheet n. 340, March 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

WHO. **The global burden of disease: 2004 update**. Geneva: World Health Organization, p. 1-146, 2008.

WRIGHT, G.D. Antibiotic Adjuvants: Rescuing antibiotics from Resistance. **Trends in Microbiology**, v. 24, p. 862-871, 2016.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T.B.; AVERY, V.M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516-1531, 2017.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO:

VALIDAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, MODIFICADORA DA ATIVIDADE DE ANTIBIÓTICOS, ANTIPARASITÁRIA E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICO E ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Licania rigida* Benth.

VALIDAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, MODIFICADORA DA ATIVIDADE DE ANTIBIÓTICOS, ANTIPARASITÁRIA E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICO E ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Licania rigida* Benth.

Resumo

Doenças infecciosas ainda persistem devido à falta de estudos científicos, negligência do governo ou falhas do sistema público de saúde ou ainda devido ao mau uso dos medicamentos pela população fazendo com que os organismos causadores dessas enfermidades adquiram resistência a terapia. Este estudo tem como objetivo identificar a composição de extratos hidroalcoólico (EHFLR) e etanólico (EEFLR) das folhas de *Licania rigida* por meio de LC-MS, avaliar as atividades antibacteriana e modificadora da atividade antibacteriana, antiparasitária e citotóxica. Os testes antibacterianos foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, a atividade antiparasitária pela metodologia de Vega et al. (2005) e a ação citotóxica com células de mamíferos. Os resultados mostraram nos dois extratos de *L. rigida* a presença de constituintes químicos como derivados de miricetina, derivado de miricetina glicosilado e derivado de miricetina ramnosídeo, sendo que o EEFLR apresentou ainda um derivado quercetina glicosilado. Para ambos os extratos estudados a CIM foi ≥ 1024 . O EEFLR quando associado ao antibiótico vancomicina apresentou sinergismo frente *S. aureus*. O EHFLR apresentou moderada toxicidade e foi efetivo apenas contra a forma epimastigota de *T. cruzi* na concentração de 1.000 $\mu\text{g/mL}$. O EEFLR, apresentou baixa toxicidade para os fibroblastos, entretanto, não apresentou eficácia contra os parasitas testados, apresentando apenas uma pequena atividade contra as formas promastigotas na maior concentração testada. Os resultados mostraram que nenhum dos extratos estudados apresentou atividade antibacteriana *in vitro*. Entretanto o EEFLR modificou de forma sinérgica a atividade do antibiótico padrão vancomicina contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e o EHFLR demonstrou atividade antiparasitária contra o *T. cruzi*.

Palavras-chave: *Licania rígida*, Atividade antibacteriana, Atividade antiparasitária, Citotoxicidade.

1. INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas foram identificadas como uma das principais causas de morte na humanidade durante muito tempo, mas a partir do século XIX quando surgiram os antibióticos houve uma diminuição no número de mortes causadas por essas enfermidades. Entretanto, com o passar dos anos as bactérias vem desenvolvendo rapidamente formas de escapar dos antimicrobianos e se instalarem com maior facilidade no hospedeiro, prejudicando-o e dessa forma levando a quadros de infecções que variam de baixa a alta gravidade (OLIVEIRA et al., 2014).

Dentre o grupo de bactérias mais comuns que se apresentam nessas infecções, temos as bactérias Gram-positiva, como as *Staphylococcus aureus*. Elas se apresentam causando infecções purulentas, como por exemplo, furúnculo, carbúnculo, abscesso, miocardite, endocardite, pneumonia, meningite, artrite bacteriana (VERHOEFF et al., 1999). Outro grupo bastante envolvido na maioria das infecções são as bactérias Gram-negativas. Como exemplo desse grupo temos as *Pseudomonas aeruginosa*, que são responsáveis por uma variedade de infecções, principalmente que acometem a pele como: infecções no trato urinário, ouvidos e olhos (MURRAY et al., 2004). Outra bactéria bastante comum a esse grupo é a *Escherichia coli*, que são responsáveis pela maioria de doenças infecciosas humanas. Esse grupo de bactérias possuem moléculas estruturais que acabam aumentando sua virulência e tornando-as mais resistentes aos antibióticos mais comuns (MURRAY et al., 2004).

Além de infecções causadas por bactérias, também temos algumas causadas por hemoparasitas. A leishmaniose é uma doença prevalente em mais de 80 países, estimando-se que cause 1,6 milhões de novos casos anualmente, dos quais cerca de 500.000 ocorra na forma visceral e 1,1 milhões cutânea ou muco cutânea (WHO, 2002). É uma doença causada por parasitas heteroxênicos do gênero *Leishmania* que se apresentam sob duas formas morfológicas durante o seu ciclo de vida: promastigota e amastigota. Outra doença parasitária é a Doença de Chagas. Trata-se de uma zoonose causada por *Trypanosoma cruzi*, que continua a persistir na Região das Américas, mesmo com a introdução de medidas de controle de vetores e transfusão de sangue mais segura, os casos ainda estão crescentes, representando um desafio para a saúde pública (WHO, 2002).

As formas de transmissão de maior importância epidemiológica são a vetorial através de insetos hematófagos, os triatomíneos (barbeiros), a transfusional, a congênita e a oral (CARVALHO et al., 2005). O ciclo biológico desse parasita é bastante complexo e possui três formas evolutivas (tripomastigota, epimastigota e amastigota) e várias espécies de triatomíneos e

demamíferos, silvestres edomésticos, que atuam respectivamente, como vetores e reservatórios do parasito (LANA; TAFURI, 2005).

Atualmente o tratamento utilizado para *Leishmania* é realizado com a anfotericina B lipossomal, pentamidina, paramomicina e miltefosine, entretanto, elas desencadeiam vários efeitos colaterais (PEREIRA et al., 2011). Já para o tratamento para *Trypanosoma cruzi*, o medicamento mais utilizado é o benzonidazol e o nifurtimox. Sabe-se que as drogas utilizadas atualmente para o combate a esses dois parasitas apresentam alta toxicidade pela produção de metabólitos, os quais comprometem os tecidos do hospedeiro devido a sua alta reatividade. Desse modo, novas pesquisas por novos fármacos se fazem necessárias.

A busca por plantas medicinais despertou a indústria farmacêutica para investir mais na busca de novos fármacos. A ação terapêutica das plantas medicinais está relacionada à presença de alguns de seus constituintes, tais como flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos, entre outros, que através de testes pré-clínicos, suas ações farmacológicas podem ser comprovadas. A espécie *Licania rígida*, popularmente conhecida como oiticica é uma árvore lenhosa, pertencente ao gênero *Licania*, da família Chrysobalanaceae. As espécies desta família são bastante utilizadas para diversas funcionalidades, dentre elas, para malária, epilepsia, diarreia, inflamações, infecções de pele e diabetes. Esse gênero é conhecido por ter uma maior quantidade de espécies utilizadas para fins terapêuticos e profiláticos (CALIXTO, 2003). Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades antibacteriana, modificadora da atividade antibacteriana, antiparasitária e citotóxica dos extratos hidroalcoólico e etanólico das folhas de *Licania rígida* Benth. (oiticica).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Botânico

Foram avaliados os extratos hidroalcoólico e etanólico das folhas de *Licania rígida* (EHFLR e EEFLR). As folhas de *Licania rígida* foram coletadas no município de Missão Velha – CE, Brasil (7° 17' 29.8" S; 39° 10' 42.4" O) em fevereiro de 2016. Quanto aos aspectos legais para esta pesquisa foi solicitada a autorização do ICMBio nº 54896-1 (Anexo A). As informações sobre a pesquisa também foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) com a autorização: A671BD0 (Anexo B). A espécie foi devidamente identificada e uma exsicata foi depositada no Herbário

Caririense Dárdano de Andrade Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri (URCA) sob o registro de nº 12.544 (Anexo C).

2.2 Determinação dos Constituintes Químicos

As folhas de *Licania rigida* benth foram submetidas a dois processos de extração hidroalcoólica e etanólica, com o rendimento de 27,14% e 66,9% respectivamente. A quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides foram realizados por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa-LCMS. As amostras dos extratos hidroalcoólico e etanólico das folhas de *Licania rigida* foram selecionadas e submetidas individualmente a análise por LC-MS, utilizando uma coluna octadecilsilano (250 x 4,6 mm, 5 µm, Luna[®] C18, Phenomenex[®]), como fase estacionária e fase móvel composta de 2 solventes: solvente A – 0,1% de ácido fórmico em água ultrapura e solvente B 0,1% de ácido fórmico em metanol (grau CLAE) com fluxo de 1,0 mL/min., em gradiente de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Tabela do gradiente de fase móvel utilizado para determinação qualitativa das amostras.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0,00	95	5
60,00	5	95
70,00	0	100
75,00	0	100
80,00	95	5
90,00	95	5

A fase estacionária foi mantida a 30 °C e o volume injetado foi de 20 µL para as amostras (1 mg/mL) no CLAE-DAD-MS para análises monitoradas de 190 a 400 nm e de 50 a 1000 m/z.

As análises desenvolvidas utilizaram um LC-20 Shimadzu[®] equipado com um sistema quaternário de bombas modelo LC - 20ADVP, degaseificador modelo DGU - 20A, detector PDA modelo SPD - 20AVP, forno modelo CTO - 20ASVP, injetor automático modelo SIL - 20ADVP e controlador modelo SCL - 20AVP. Acoplado a um espectrômetro de massas ESI-IT da Bruker Daltonics[®], equipado com uma fonte de ionização por electrospray operando no modo de analisador e por captura de ions positivos com trap para dividir o eluente do HPLC e uma taxa de fluxo de 0,2 mL/min. foi introduzido na fonte. Os parâmetros do espectrômetro de massa utilizados

foram: tensão capilar, 3,5 kV; temperatura de dessolvatação de 320 °C; fluxo de gás de 10 L/min.; pressão de 60 PSI, utilizando nitrogênio como gás de secagem e nebulização.

2.3 Protocolos Experimentais *in vitro*

2.3.1 Testes antibacterianos

2.3.1.1 Microrganismos

Os experimentos foram realizados com isolados clínicos de *Eschechia coli* (EC06), *Pseudomonas aeruginosa* (PA24) e *Staphylococcus aureus* (SA10). Todas as linhagens foram mantidas em meio *Heart Infusion Agar slants* (HIA, Difco). Antes dos ensaios as células foram cultivadas por 24 horas a 37 °C em *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco). As linhagens acima citadas são oriundas do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri (LMBM-URCA). Os perfis de resistência das cepas usadas estão de acordo com Dias et al. (2018).

2.3.1.2 Drogas

Os antibióticos selecionados para os testes foram oxacilina, cloranfenicol e vancomicina. As drogas foram obtidas do Laboratório Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO, EUA). Além disso, estes componentes foram dissolvidos em água destilada e esterilizada antes de serem utilizadas na concentração de 1024 µg/mL.

2.3.1.3 Preparo da solução inicial e das soluções de teste

No preparo da solução inicial, 10 mg dos extratos hidroalcoólico e etanólico foram solubilizados em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO – Merk, Darmstadt, Alemanha), obtendo assim uma concentração inicial de 10 mg/mL. Posteriormente, estas soluções foram microdiluídas em água destilada estéril atingindo-se assim a concentração de 1024 µg/mL, reduzindo assim a concentração de DMSO para menos de 10%, evitando ocasionar efeito tóxico do DMSO (MATIAS et al., 2010).

2.3.1.4 Concentração Inibitória Mínima - CIM

Para verificar a ação dos extratos frente a linhagens de bactérias multirresistentes foi adotado o procedimento de microdiluição em caldo (NCCLS, 2003), onde soluções foram preparadas em microtubos tipo *ependorf*[®] contendo cada um deles 1 mL de solução com 900 µL de BHI 10% e 100 µL da suspensão bacteriana com 10⁶ UFC segundo escala de McFarland. Cada placa foi preenchida no sentido numérico adicionando-se 100 µL desta solução em cada poço em um total de 96 poços, e em seguida realizou-se a microdiluição seriada com a solução de 100 µL do extrato, variando nas concentrações de 512 a 4 µg/mL. As placas foram levadas à incubadora por 24 horas a 37 °C. Para evidenciar a CIM das amostras, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01 % (p/v). Após a incubação, 20 µL da solução indicadora de resazurina foram adicionados em cada cavidade e as placas passaram por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. Nos poços quando ocorre a mudança da coloração azul para rosa é devido a redução do pH da resazurina, indicando que houve crescimento bacteriano. A CIM foi determinada como a menor concentração na qual nenhum crescimento foi observado, sendo esta evidenciada pela cor azul inalterada (PALOMINO, 2002). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

2.3.1.5 Modificação da atividade de antibióticos

Para verificar se os extratos de *Licania rigida* Benth. modificariam a ação dos antibióticos frente às cepas testadas, utilizou-se a metodologia proposta por Coutinho et al. (2008), onde as soluções dos extratos foram testadas em concentração sub-inibitória (CIM/8). Foram preparados microtubos tipo *ependorf*[®] contendo cada um deles 1,5 mL de solução de BHI 10 %, 150 µL da suspensão bacteriana e 23 µL do extrato (CIM/8). Para o controle foram preparados microtubos tipo *ependorf*[®] com 1,5 mL de solução contendo 1.350 µL de BHI (10 %) e 150 µL de suspensão de microrganismos. As placas foram preenchidas no sentido alfabético adicionando-se 100 µL desta solução em cada poço. Em 100 µL do antibiótico foi misturada ao primeiro poço, procedendo a microdiluição em série, numa proporção 1:1 até a penúltima cavidade. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata. Os antibióticos foram avaliados em concentrações que variaram de 512 a 0,5 µg/mL.

2.3.2 Testes antiparasitários e de citotoxicidade

2.3.2.1 Linhagens celulares utilizadas

Para os testes *in vitro* de *T. cruzi*, foi utilizado o clone CL-B5 (BUCKNER et al. 1996). Os parasitos, transfectados de forma estável com o gene para a β -galactosidase de *Escherichia coli* (lacZ), foram fornecidos pelo Instituto Conmemorativo Gorgas (Panamá). As formas epimastigotas foram cultivadas a 28° C em Meio de cultura *Liver Infusion Tryptose Broth* (Difco, Detroit, MI), suplementado com Soro Fetal Bovino 10% (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (Ern, S.A., Barcelona, Spain) e estreptomicina (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain), conforme descrito por Le Senne et al. (2002).

Culturas de *Leishmania* spp. foram obtidas do *Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, Asunción, Paraguay - IICS e identificadas por análise isoenzimática. A manutenção das linhagens, forma de cultivo e isolamento das formas promastigotas de *Leishmania* spp. seguiram os procedimentos descritos por Roldos et al. (2008). Os ensaios de inibição das formas promastigotas foram realizados utilizando as linhagens de *L. braziliensis* (MHOM/CO/88/UA301) e *L. infantum* (MHOM/ES/92/BCN83), cultivadas a 22 °C em meio Schneider's *Drosophila*, suplementado com SFB 20%.

Para os ensaios de citotoxicidade foi usada a linhagem de fibroblastos NCTC929, cultivada em *Minimal Essential Medium* (Sigma). O meio de cultura foi suplementado com SFB inativada por calor (10%), penicilina G (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As culturas foram mantidas a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A viabilidade destas linhagens foi avaliada através do uso da resazurina como método colorimétrico (ROLÓN et al., 2006).

2.3.2.2 Reagentes

Resazurina sódica foi obtida da Sigma–Aldrich (St Louis, MO) e estocada a 4 °C ao abrigo da luz. A solução de resazurina foi preparada com tampão fosfato 1%, pH 7 e esterilizada por filtração antes de ser utilizada. O Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) foi dissolvido em uma solução de Triton X-100 0,9% (pH 7.4). Penicilina G (Ern, S.A., Barcelona, Spain), estreptomicina (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain) e Dimetilsulfóxido (DMSO) também foram utilizados.

2.3.2.3 Teste de atividade antiepipimastigota

Foi realizado em microplacas com 96 cavidades, com culturas na fase exponencial, conforme descrito por Vega et al. (2005). Epimastigotas foram inoculados em uma concentração de $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ em 200 μL de caldo de fígado triptose. As placas foram então incubadas com as drogas nas concentrações de 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ a 28 °C por 72 h. Posteriormente, foram adicionados 50 μL da solução de CPRG, de forma a atingir uma concentração final de 200 μM . As placas foram incubadas por um tempo adicional de 6 h a 37 °C e submetidas à visualização sob 595nm. Cada experimento foi realizado duas vezes e de forma independente, sendo cada concentração testada em triplicata em cada experimento. A eficiência de cada composto foi estimada através do cálculo do percentual de atividade antiepipimastigota (AE%).

2.3.2.4 Teste de atividade antipromastigota

Culturas de formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* foram cultivadas até uma concentração de 10^6 células/mL e então transferidas para o teste. Os compostos foram dissolvidos em DMSO até as concentrações a serem testadas e transferidos para as microplacas. Cada ensaio foi realizado em triplicata. A atividade dos compostos foi avaliada após 72 h por contagem direta das células após diluições seriadas e comparadas com um controle não tratado. A eficiência de cada composto foi estimada através do cálculo do percentual de atividade antipromastigota (AP%).

2.3.2.5 Teste de citotoxicidade

Fibroblastos NCTC929 foram plaqueados em placas de microdiluição de 96 cavidades a uma concentração final de 3×10^4 células/cavidade. As células foram cultivadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO_2 . Após isso, o meio de cultura foi removido e os compostos foram adicionados a 200 μL , sendo realizado um novo cultivo por 24 h. Após esta incubação, 20 μL de uma solução de Resazurina 2 mM foi adicionada em cada cavidade. As placas foram incubadas por 3h e a redução da resazurina foi determinada através de dupla absorbância nos comprimentos de onda de 490 e 595 nm. O valor do controle (branco) foi subtraído. Cada concentração foi testada em triplicata. A citotoxicidade de cada composto foi estimada através do cálculo do percentual de citotoxicidade (C%).

2.4 Análise Estatística

Os dados foram expressos como Médias Geométricas (M.G.) e Erro Padrão da Média (E.P.M.). Para os dados obtidos nos testes de concentração inibitória mínima e modificação da ação dos antibióticos a significância estatística foi avaliada com um teste ANOVA (Análise de Variância) de duas vias, seguida pelo teste de *Bonferroni post hoc* (onde $p < 0,05$ e $p < 0,0001$ são considerados significativos e $p > 0,05$ não significativo), usando o *software Graph Pad Prism 6.0*. Já para os dados dos testes antiparasitários e de citotoxicidade, a concentração efetiva (CE_{50}) e concentração letal (CL_{50}) foram calculadas pelo *software Probitos Tsk 1.5*.

3. RESULTADOS

A partir da análise cromatográfica das amostras descritas nas Tabelas 2 e 3 foi possível sugerir a presença de compostos da classe dos flavonóides, sendo encontrados derivado de miricetina e um derivado de miricetina glicosilado, bem como mirecetina ramnosídeo e um derivado quercetina glicosilado, por meio da similaridade entre a absorção ultravioleta. espectro, razão de massa de carga e fragmentação (MS) com dados descritos na literatura e no banco de dados GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*).

Tabela 2. LC-MS Análise cromatográfica do extrato Hidroalcoólico das folhas de *Licania rigida* (EHFLR).

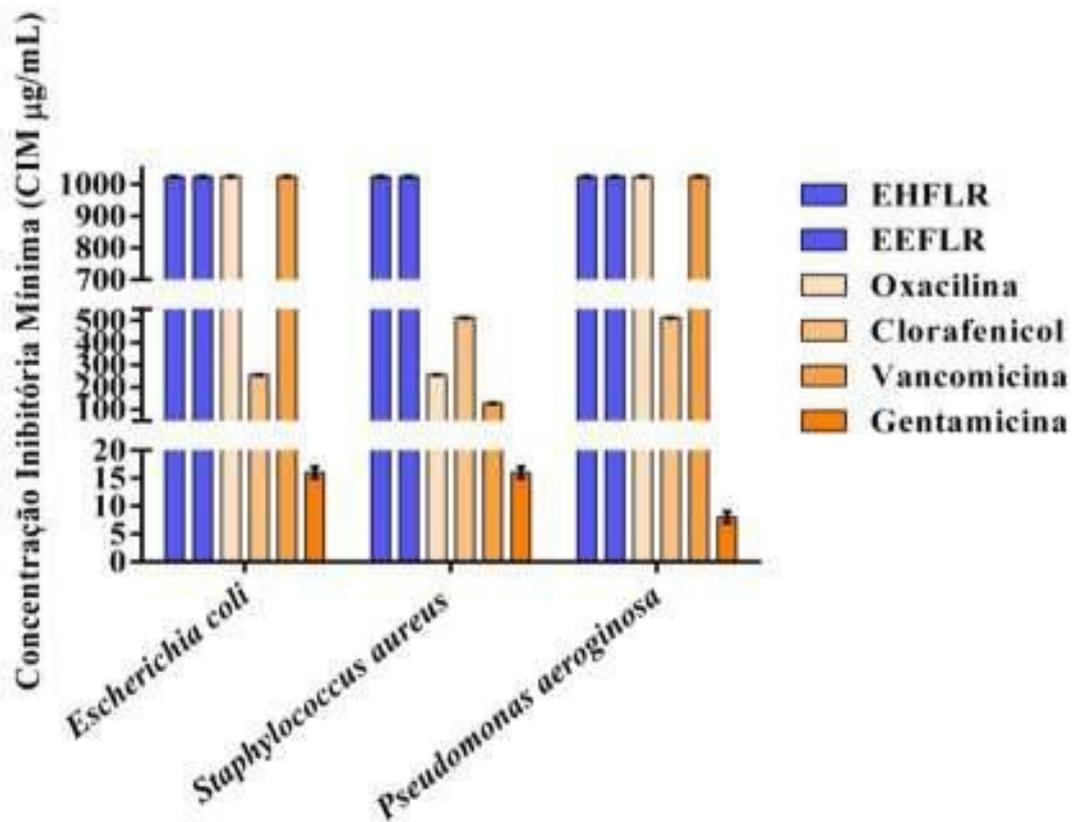
Tempo de retenção (min)	[M-H] experimental (m/z)	MS ² [M-H] Experimental (m/z)	Composto Sugerido	Referência
20,5	479,05	316,92	Derivado de Miricetina	Saldanha, Vilegas, Dokkedal (2013)
21,0	449,06	316,93	Derivado de Miricetina Glicosilado	Saldanha, Vilegas, Dokkedal (2013)
22,3	463,04	315,95	Miricetina - Ramnosídeo	Cho et al., (2004)

Tabela 3. LC-MS Análise cromatográfica do extrato etanólico das folhas de *Licania rigida* (EEFLR).

Tempo de retenção (min.)	[M-H] experimental (m/z)	MS ² [M-H] Experimental (m/z)	Composto Sugerido	Referência
20,5	479,06	269,87/316,92	Derivado de Miricetina	Saldanha, Vilegas, Dokkedal (2013)
21,1	449,02	316,94	Derivado de Miricetina Glicosilado	Saldanha, Vilegas, Dokkedal (2013)
22,3	463,05	315,96	Miricetina - Ramnosídeo	Cho et al., (2004)
23,6	463,10	300,97	Derivado de Quercetina Glicosilado	Saldanha, Vilegas, Dokkedal (2013)

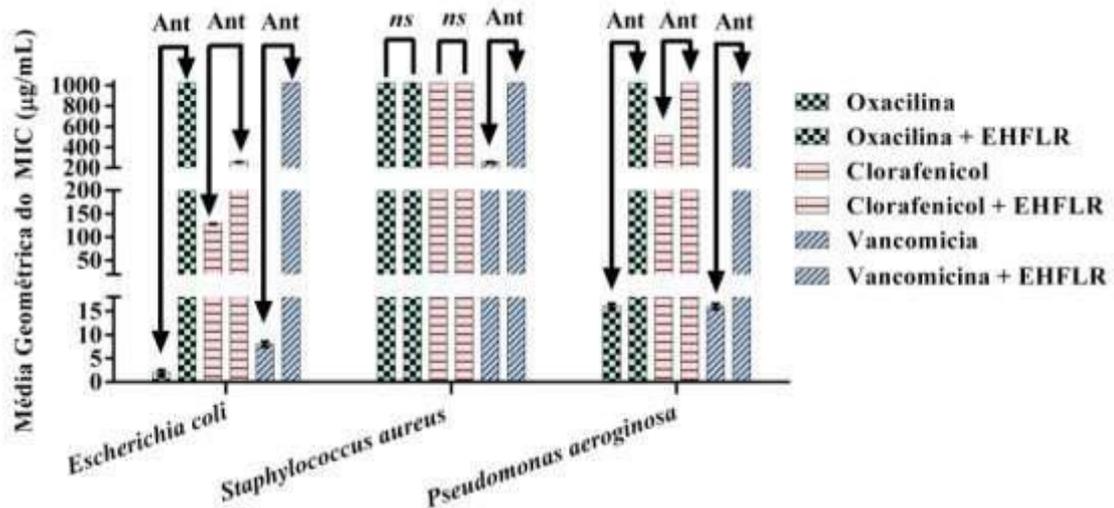
Ao observar o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos droalcoólico e etanólico das folhas de *Licania rigida* frente às bactérias *Eschechia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, obteve-se resultados da CIM ≥ 1.024 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 4). Na potencialização da atividade dos antibióticos, o EHFLR apresentou ação antagônica para *Eschechia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* frente a todos os antibióticos, e ação antagônica para *Staphylococcus aureus* quando associado com vancomicina (Figura 5). Na associação dos antibióticos com o EEFLR, apresentou sinergismo frente a *Staphylococcus aureus* quando associado com a vancomicina, antagonismo para *Pseudomonas aeruginosa* quando associado com oxacilina e clorafenicol, e antagonismo para *Eschechia coli* quando associado com oxacilina (Figura 6).

Figura 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Extrato hidroalcoólico e etanólico das folhas de *Licania rigida* (EHFLR e EEFLR) e de antibióticos padrões contra cepas bacterianas.



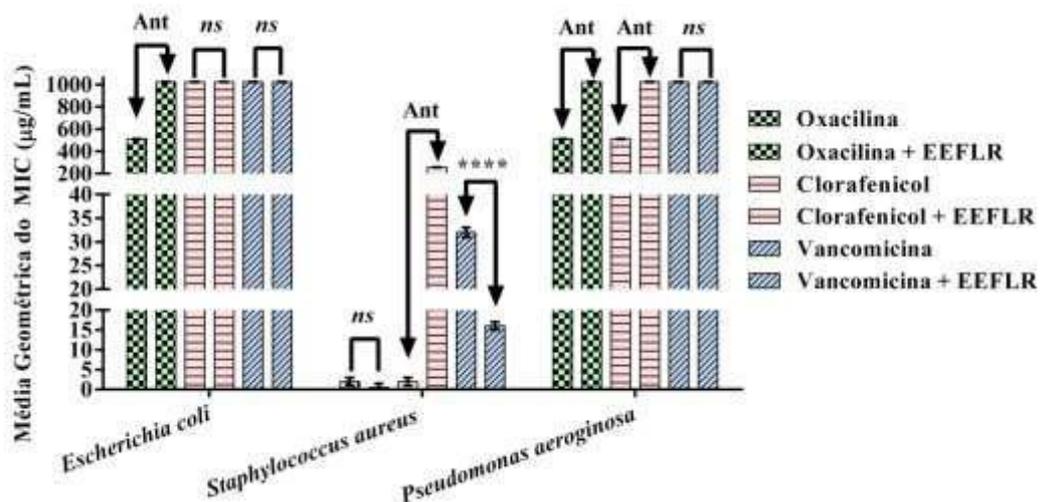
Os valores representam a média geométrica \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média). Two-way ANOVA tendo por *pos hoc* o teste de *Bonferroni*.

Figura 5. Efeito da associação do Extrato hidroalcoólico das folhas de *Licania rigida* (EHFLR) com antibióticos padrões, sobre cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.



Os valores representam a média geométrica \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média). Two-way ANOVA tendo por *pos hoc* o teste de *Bonferroni*. Ant. = Antagonismo; ns = não significante.

Figura 6. Efeito da associação do Extrato etanólico das folhas de *Licania rigida* (EEFLR) com antibióticos padrões, sobre cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.



Os valores representam a média geométrica \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média). Two-way ANOVA tendo por *pos hoc* o teste de *Bonferroni*. **** $p < 0001$ vs controle antibiótico; Ant. = Antagonismo; ns = não significante.

A Tabela 4 mostra a atividade tripanocida, anti-leishmanial e citotóxica dos extratos hidroalcoólico e etanólico das folhas de *Licania rigida*. O EHFLR apresentou toxicidade moderada com $CL_{50} = 554,58 \mu\text{g/mL}$. Em relação à avaliação da atividade antiparasitária, o EHFLR foi eficaz contra os parasitas na forma epimastigota com um $CE_{50} = 726,99 \mu\text{g/mL}$.

Nos testes realizados com o EEFLR foi demonstrada baixa toxicidade com $CL_{50} \geq 1000 \mu\text{g/mL}$. Em relação à avaliação da atividade antiparasitária, o produto apresentou baixa eficácia contra todos os parasitas testados com uma $CE_{50} \geq 1000 \mu\text{g/mL}$. O extrato foi o mais efetivo contra as formas promastigotas testadas inibindo 29,96 e 30,63% na maior concentração.

Tabela 4. Atividade antiparasitária e citotóxica dos extratos EHFLR e EEFLR.

Amostra	$\mu\text{g/mL}$	%AE	%AP (Li)	%AP (Lb)	%C
EHFLR	1000	86,82 \pm 0,42	0,00 \pm 1,56	6,75 \pm 0,07	56,98 \pm 0,14
	500	11,86 \pm 0,71	0,00 \pm 1,27	8,50 \pm 0,61	54,25 \pm 0,99
	250	0,00 \pm 2,47	0,00 \pm 0,82	11,49 \pm 1,06	0,00 \pm 2,76
EEFLR	1000	21,47 \pm 0,42	29,96 \pm 1,06	30,63 \pm 0,24	39,21 \pm 1,51
	500	0,00 \pm 0,57	0,00 \pm 0,99	18,66 \pm 2,94	5,26 \pm 2,90
	250	0,00 \pm 1,27	0,00 \pm 3,75	12,71 \pm 0,78	0,39 \pm 0,02

EHFLR- extrato hidroalcoólico das folhas de *Licania rigida*; EEFLR-extrato etanólico das folhas de *Licania rigida*; % AP - Percentual de formas promastigotas mortas; Lb - *Leishmania brasiliensis*; Lb - *Leishmania infantum*; \pm % DP - desvio padrão; % AE - Percentual de formas epimastigotas mortas; % C - % C - Percentual de fibroblastos mortos NCTC 929.

4. DISCUSSÃO

A LC-MS é um método usado para a identificação de produtos naturais bioativos, e uma vez que os extratos vegetais são misturas altamente complexas, a LC-MS é uma opção que traz vantagens ao permitir de forma rápida e com alta sensibilidade a separação de metabólitos de diferentes polaridades a baixa temperatura, sendo necessário apenas que as moléculas sejam solúveis na fase móvel (WOLFENDER, 2009; WOLFENDER et al., 2013).

A análise do LC-MS para o EHFLR e o EEFLR neste estudo demonstraram que estes possuem simultaneamente derivado de miricetina, derivado de miricetina glicosilado e miricetina ramosídeo. O EEFLR ainda apresentou o derivado de quercetina glicosilado. Estes componentes, além de taninos, saponinas, esteróides livres e quinonas também são considerados como componentes majoritários encontrados na composição das espécies de plantas pertencentes à família da *Licania rigida* (CARVALHO et al., 2005; GOMES et al., 2006).

Os compostos encontrados na análise por LC-MS pertencem ao grupo dos flavonoides, um dos mais característicos grupos de metabólitos presentes em plantas. Na família Chrysobalanaceae esses compostos desempenham um papel importante por serem importantes quimiomarcadores taxonômicos (BRACA et al., 2002). Ainda segundo Braca et al. (2001), as folhas das espécies *Licania licaniaeflora* e *Licania heteromorpha* exibem uma atividade antioxidante em ensaios *in vivo* e *in vitro*, devido à presença dos compostos Flavonoides encontrados nestas espécies, o que corrobora com nosso estudo, que apresenta estas substâncias em sua composição, mesmo tratando-se de espécies diferentes, no entanto, pertencentes a mesma família.

Os resultados da atividade antibacteriana dos EHFLR e EEFLR analisados não apresentaram efeitos inibitórios significativos do ponto de vista clínico frente às bactérias aqui analisadas, uma vez que a CIM foi ≥ 1024 $\mu\text{g/ml}$. De acordo com a análise de MORAIS et al. (2015) Estudos que analisaram a atividade bacteriana direta de extratos de espécies pertencentes a mesma da família de *Licania rígida* tem apresentado variação nos resultados de CIM frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, podendo inibirem o crescimento bacteriano ou não destes grupos de microrganismos, sendo esta variação de atividade justificada pela variação na composição química que ocorrem entre as espécies, pelo tipo de extrato preparado e pelas condições experimentais.

Estudos demonstram que é reconhecida a ação sinérgica de produtos naturais quando associados com antibióticos normalmente usados no tratamento de infecções bacterianas, determinando uma diminuição na sua CIM (FIGUEREDO et al., 2013; TINTINO et al., 2015; DIAS et al., 2018). A habilidade que produtos naturais têm de modificar a ação de antimicrobianos pode ser vista a partir de estudos que comprovam que associação de antibióticos e extratos de plantas podem atuar revertendo a resistência das bactérias, dificultado a bomba de efluxo ou modificando parede celular bacteriana e a membrana celular (COUTINHO et al., 2009; COUTINHO et al., 2010a,b). Sabe-se que flavonóides e terpenos possuem ação antimicrobiana (MASSUARI et al., 2016; SILVA e BIESK, 2018). Também existem registros de que flavonóides e alcalóides são potencializadores da ação de antibióticos (TEFFO et al., 2010; ARARUNA et al., 2012), e são sintetizados por plantas em resposta a infecções microbianas (DIXON et al., 1983;

HO et al., 2001, TINTINO et al., 2015), sendo capazes de alterar a parede celular ou destruir a membrana plasmática das células bacterianas, facilitando a absorção dos antibióticos (MATIAS et al., 2010; FIGUEREDO et al., 2013).

Na modificação da ação dos antibióticos, a bactéria Gram-positiva *S. aureus* foi sensível ao EEFLR (associado a vancomicina) comparada às demais cepas. O sinergismo para *S. aureus* e os antagonismos para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* concordam com os dados encontrados na literatura, os quais demonstram que as bactérias Gram-negativas são mais resistentes à ação de produtos naturais, como extratos e óleos essenciais, pois a membrana externa presente nessas bactérias forma um envelope complexo, protegendo-as contra a ação desses agentes antimicrobianos (OLADIMEJI et al., 2004; HOLLEY; PATTEL, 2005; VERAS et al., 2013).

O antagonismo é descrito como sendo resultado da associação de uma droga a um produto natural, onde este último dificulta ou inibe a ação do fármaco (SARAIVA, 2012; TINTINO et al., 2015). De acordo com as análises de GRANOWITZ; BROWN (2008) e de DIAS et al. (2018), efeitos antagonísticos resultantes do uso combinado entre antibióticos e produtos naturais podem ser atribuídos a ocorrência de uma quelação mútua. O que pode justificar os resultados de antagonismos aqui observados.

Para ambos os extratos de *Licania rigida* testados (EHFLR e EEFLR), a análise LC-MS demonstrou a presença de vários derivados de quercetina e miricetina (Tabelas 2 e 3). Estudos têm comprovado que a quercetina tem efeito antiprotozoário contra *Plasmodium falciparum* (IC=14 µM), *Trypanosoma brucei* (IC=13,2 µM), *Leishmania donovani* (IC=63,8 µM) (CAMACHO et al., 2002). A quercetina foi descrita com uma atividade leishmanicida *in vitro* significativa contra a *L. donovani* amastigotas, células com um IC=1,0 µg/mL e uma inibição de 15,3% destes em camundongos infectados. A quercetina e a miricetina também demonstraram atividade tripanocida *in vitro* contra *Trypanosoma brucei rhodesiense* (IC=15,9 µg/mL e IC=8,3 µg/mL) respectivamente (TASDEMIR et al., 2006).

Os resultados obtidos no estudo sugerem que o EHFLR foi eficaz na inibição da linhagem epimastigota testada. Entretanto, nenhum dos extratos analisados foi eficaz contra as formas promastigotas, apenas o extrato etanólico inibiu uma pequena parcela das duas espécies de *Leishmania* testadas. Em estudos com o extrato metanólico da espécie *Parinari curatellifolia* pertencente a mesma família da espécie em estudo, foi relatado atividade antitrypanosomal e uma baixa atividade antileishmanial (SAWADOGO et al., 2011).

Neste estudo o efeito citotóxico dos extratos nos fibroblastos foi de moderado a baixo em todas as concentrações testadas (ROSAS et al, 2007). Pessoa e colaboradores (2016) testando os

extratos etanólicos de *L. rigida* e *L. tomentosa* quanto a possível citotoxicidade em linhagens celulares cancerígenas do cancro da mama humano MCF-7 e adenocarcinoma colorrectal Caco-2, perceberam que nas concentrações de até 250 µg/mL os extratos não mostraram citotoxicidade.

Fibroblastos são células encontradas no tecido conjuntivo de mamíferos. Estas células têm sido geralmente escolhidas para realização de testes de citotoxicidade porque são de fácil manutenção e produzem resultados que apresentam alta correlação com os biológicos e ainda por estarem presentes em ferimentos, sendo o principal tipo de célula presente na regeneração (RATNER et al., 2004). Os testes de toxicidade são elaborados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES e FORBES, 1994). Nesse sentido, os resultados podem fornecer informações valiosas para a triagem de produtos naturais que apresentem condições de serem considerados como prováveis candidatos a fármacos.

5. CONCLUSÃO

A análise química evidenciou a presença de compostos da classe dos flavonóides. Os extratos hidroalcolico e etanólico das folhas de *Licania rigida* não demonstraram atividade antibacteriana, entretanto o EEFLR demonstrou eficácia em potencializar a atividade do antibiótico vancomicina. Ambos os extratos apresentaram baixa toxicidade aos fibroblastos. Ainda o EHFLR apresentou moderada atividade contra a forma epimastigota do protozoário *Trypanosoma cruzi*.

Os dados sugerem que *L. rigida* possui compostos bioativos capazes de potencializar o efeito dos antibióticos comerciais, bem como apresentou ação antiparasitária e baixa citotoxicidade, sendo, portanto, um ponto de partida para estudos adicionais capazes de verificar a eficácia sistêmica e elucidar as informações adicionais que estejam relacionadas a questões clínicas que ocorrem no ser humano e demais espécies afetadas por estes patógenos.

CONFLITO DE INTERESSE

Nenhum.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela bolsa de mestrado de Luzia Paulo da Cruz.

REFERÊNCIAS

- ARARUNA, M.K.; BRITO, A.S.; MORAIS-BRAGA, M.F.; SANTOS, K.K.; SOUZA, T.M.; LEITE, T.R. Evaluation of antibiotic and antibiotic modifying activity of pilocarpine and rutin. **Indian Journal of Medicinal Research**, v. 135, n. 2, p. 252-254, 2012.
- BRACA, A.; SORTINO, C.; MÉNDEZ, J.; MORELLI, I. Triterpenes from *Licania licaniaeflora*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 585-587, 2001.
- BRACA, A.; LUNA, D.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Flavonoids from *Licania apetala* and *Licania licaniaeflora* (Chrysobalanaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 3, p. 271-273, 2002.
- BUCKNER, F.S.; VERLINDE, C.L.; LA FLAMME, A.C.; VAN VOORHIS, W.C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing betagalactosidase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 40, p. 2592-2597, 1996.
- CAMACHO, M.R.; PHILLIPSON, J.D.; CROFT, S.L.; MARLEY, D.; KIRBY, G.C.; WARHURST, D.C. Assessment of the Antiprotozoal Activity of *Galphimia glauca* and the Isolation of New Nor-secofriedelanes and Nor-friedelanes. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 10, p. 1457-1461, 2002.
- CARVALHO, M.G.; CÂNDIDO, L.F.O.; COSTA, P.M.; RUMJANEK, M. Chromones from *Licania arianae* (Chrysobalanaceae). **Natural Products Research**, v. 19, p. 5-12, 2005.
- COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328-330, 2008.
- COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P. Potentiating effect of *Mentha arvensis* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **In Vivo**, v. 23, p. 287-289, 2009.
- COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; LIMA, E.O. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comparative Immunology Microbiology & Infections Diseases**, v. 33, p. 467-471, 2010a.
- COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JR, J.P.; LIMA, E.O. Potentiation of antibiotic activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. **Journal of Medicine Food**, v. 13, p. 1024-1026, 2010b.
- DIAS, D.Q.; SALES, D.L.; ANDRADE, J.C.; SILVA, A.R.P.; TINTINO, S.R.; OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.; DELMONDES, G.A.; ROCHA, M.F.G.; COSTA, J.G.M.; ALVES, R.R.N.;

FERREIRA, F.S.; COUTINHO, H.D.M.; ALMEIDA, W.O. Body fat modulated activity of *Gallus gallus domesticus* Linnaeus (1758) and *Meleagris gallopavo* Linnaeus (1758) in association with antibiotics against bacteria of veterinary interest. **Microbial pathogenesis**, v. 124, p. 163-169, 2018.

DIXON, R.A.; DEY, P.M.; LAMB, C.J. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology**, v. 55, p. 1-69, 1983.

FIGUEREDO, F.G.; FERREIRA, E.O.; LUCENA, B.F.F.; TORRES, C.M.G.; LUCETTI, D.L.; LUCETTI, E.C.P. Modulation of the antibiotic activity by extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **Biomed Research International**, v. 2013, p.1-5, 2013.

FORBES, V.E.; FORBES, T.L. **Ecotoxicology in theory and practice**. Londres: Chapman and Hall, 1994.

GOMES, M.L.; OLIVEIRA, J.L.; JARDIM, M.A.G.; SILVA, J.C. Usos medicinais e composição química das folhas de *Licania macrophylla* Benth. (Chrysobalanaceae). **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 87, n. 1, p. 26-29, 2006.

GRANOVITZ, E.V.; BROWN, R.B. Antibiotic adverse reactions and drugs interactions. **Critical Care Clinics**, v. 24, p. 421-442, 2008.

HO, K.Y.; TSAI, C.C.; HUANG, J.S.; CHEN, C.P.; LIN, T.C.; LIN, C.C. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitisidaea*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p.187-191, 2001.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 273-292, 2005.

LE SENNE, A.; MUELAS-SERRANO, S.; FERNANDEZ-PORTILLO, C.; ESCARIO, J.A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1101-1105, 2002.

MATIAS, E.F.F.; SANTOS, K.K.A.; ALMEIDA, T.S.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Atividade Antibacteriana *In vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, p. 294-298, 2010.

MORAIS, L.V.F. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de *Licania rigida* e *Turnera ulmifolia***. 2015. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Vento de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

MURRAY, PATRICK, R.; ROSENTHAL, KS.; PFALLER, MA. **Microbiologia médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically**. 6ªed. Wayne, PA: NCCLS Approved Standart M7-A6, 50-62, 2003.

OLADIMEJI, F.A.; ORAFIDIYA, L.O.; OKEKE, I.N. Physical properties and antimicrobial activities of leaf essential oils of *Lippia multiflora* Moldenke. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 14, p. 162-168, 2004.

OLIVEIRA, A.L.D.; SOARES, M.M.; SANTOS, T.C.D.; SANTOS, A. Mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos na infecção urinária. **Revista Uningá Review**, v. 20, n. 3, p. 65-71, 2014.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PESSOA, I.P.; LOPES NETO, J.J.; ALMEIDA, T.S.; FARIAS, D.F.; VIEIRA, L.R.; MEDEIROS, J.L.; BOLIGON, A.A.; PEIJNENBURG, A.; CASTELAR, I.; CARVALHO, A.F.U. Polyphenol Composition, Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Seeds from Two Underexploited Wild *Licania* Species: *L. rigida* and *L. tomentosa*. **Molecules**, v. 21, n. 1755, 2016.

RATNER, B.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. 2ª ed., New York: Elsevier Academic Press, 2004.

ROLDOS, V.; NAKAYAMA, H.; ROLÓN, M.; MONTERO-TORRES, A.; TRUCCO, F.; TORRES, S.; GÓMEZ-BARRIO, A. Activity of a hydroxybiphenyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*: In silico, *in vitro* and *in vivo* activity studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1797-1807, 2008.

ROLÓN. M.; SECO, E.M.; VEJA, C.; NOGAL, J.J.; ESCARIO, J.A.; GÓMEZ-BARRIO, A.; MALPARTIDA, F. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, n. 2, p. 104-109, 2006.

SARAIVA, R.M.C. **Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente a bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas**. 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

SAWADOGO, W.R.; DOUARON, G.L.E.; MACIUK, A.; BORIES, C.; LOISEAU, P.M.; FIGADÈRE, B.; GUISSOU, I.P.; NACOUлма, O.G. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of five medicinal plants from Burkina Faso. **Parasitology Research**, v. 110, p. 1779-1783, 2011.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUN, F.; RUEDI, P. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1352-1364, 2006.

TEFFO, L.S.; ADEROGBA, M.A.; ELOFF, J.N. Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts. **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 25-29, 2010.

TINTINO, S.R.; NETO, A.A.C.; MENEZES, I.R.A.; OLIVEIRA, C.D.M.; COUTINHO, H.D.M. Antimicrobial Activity and Combined Effects on Antifungal and Antibacterial Drugs the Fruit of *Morinda citrifolia* L. **Acta Biológica Colombiana**, v. 20, n. 3, p. 193-200, 2015.

VEGA, C.; ROLÓN, M.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.R.; ESCARIO, J.A.; GÓMEZ-BARRIO, A.A. New pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotas expressing beta-galactosidase. **Parasitology Research**, v. 95, p. 296-298. 2005.

VERAS, H.N.H.; RODRIGUES, F.F.G.; BOTELHO, M.M.A.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M. Enhancement of aminoglycosides and β -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Timol. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 2790-2795, 2007.

VERHOEFF, J.; BEAUJEAN, D.; VLOK, H.; BAARS, A.; MEYLER, A.; WERKWN, V.D.C. A Dutch approach to methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 18, n. 7, p. 461-466, 1999.

WHO - World Health Organ Tech. Rep. Ser. **Control of Chagas disease**. v. 905, p. 1-109, 2002.

WOLFENDER, J.L. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta Medicinal**, v. 75, n. 7, p. 719-734, 2009.

WOLFENDER, J.L.; RUDAZ, S.; CHOI, Y.H.; KIM, H.K. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 1056-1090, 2013.

ANEXOS

ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DO SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54896-1	Data da Emissão: 12/07/2016 12:11	Data para Revalidação*: 11/08/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Enaide Soares Santos	CPF: 014.374.333-32
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE <i>Licania rigida</i> Benth (oitica) EM ROEDORES	
Nome da Instituição : Universidade Regional do Cariri	CNPJ: 06.740.864/0001-26

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	coleta das folhas de <i>licania rigida</i>	08/2016	07/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão opiar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Portar a autorização nas atividades de coleta e transporte do material biológico. Comunicar à APA Chapada do Araripe o início das atividades de coleta. A coleta em propriedades privadas necessita de autorização dos proprietários.
---	---

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		CE	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL CHAPADA DO ARARIPE	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Licania rigida</i>

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 42268788



Página 1/3

ANEXO B – CADASTRO DO SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A671BD0

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A671BD0**
 Usuário: **URCA**
 CPF/CNPJ: **06.740.864/0001-26**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

licania licania rigida

Título da Atividade: **ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIPARASITÁRIA DOS EXTRATOS
 HIDROALCOÓLICO E ETANÓLICO DAS FOLHAS DE Licania rigida Benth
 (oitica)**

Equipe

Luzia Paulo da Cruz **URCA**

Parceiras Nacionais

06.740.864/0001-26 / Universidade Regional do Cariri

Data do Cadastro: **01/12/2018 22:12:54**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 17:48 de 14/01/2019.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO C – NÚMERO DE HERBÁRIO



Herbário Caririense Dárdano de Andrade – Lima
Universidade Regional do Cariri - URCA

Número de Herbário

Remetente: N° 16.2016

HERBÁRIO CARIENSE DÁRDANO DE ANDRADE-LIMA (HCDAL/URCA)

Contato: Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva (herbario@urca.br)

Universidade Regional do Cariri - URCA

Departamento de Ciências Biológicas

Rua: Cel. Antonio Luiz, 1161

Campus Pimenta

Crato - Ceará - Brasil

CEP: 63.105-100

Destinatário: Data: 20.09.2016

Contato: Enalide Soares Santos

Universidade Regional do Cariri

Laboratório de Farmacologia e Química Molecular

N° Amostras: 01

Tipo de Operação: Número de Herbário

	N° HERBÁRIO	NOME POPULAR	FAMÍLIA	NOME CIENTÍFICO	RESPONSÁVEL
01	12.344	Oititeira	Chrysobalanaceae	<i>Esania rigida</i> Benth.	Aná MORAIS MENDONÇA


Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva
Curadora do HCDAL

ANEXO D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Ms. Ref. No.: CIMID-D-19-00170

Title: EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITIES, MODIFIER OF THE ACTIVITY OF ANTIBIOTICS, ANTIPARASITARY AND CYTOTOXICITY OF THE HYDROALCOOLIC AND ETHANOLIC EXTRACTS OF THE LEAVES OF *Licania rigida* Benth.

Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases

Dear Dr. Dias,

Your submission "EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITIES, MODIFIER OF THE ACTIVITY OF ANTIBIOTICS, ANTIPARASITARY AND CYTOTOXICITY OF THE HYDROALCOOLIC AND ETHANOLIC EXTRACTS OF THE LEAVES OF *Licania rigida* Benth." has been assigned manuscript number CIMID-D-19-00170.