



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA E RECURSOS  
NATURAIS - PPGDR

MARAIZA GREGORIO DE OLIVEIRA

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
ANTIMICROBIANO E DA TOXICIDADE DE EXTRATOS DA CASCA DO CAULE  
DE *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (APOCYNACEAE)**

CRATO-CE

2024

MARAIZA GREGORIO DE OLIVEIRA

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
ANTIMICROBIANO E DA TOXICIDADE DE EXTRATOS DA CASCA DO CAULE  
DE *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (APOCYNACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais da Universidade Regional do Cariri-URCA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Marivando Barros

CRATO-CE

2024

Eu, Maraiza Gregorio de Oliveira, \_\_\_\_\_ autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada pelo autor através do sistema de geração automático da Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri - URCA

Oliveira, Maraiza Gregorio de

048p Prospecção Fitoquímica e Avaliação do potencial Antimicrobiano e da Toxicidade de Extratos da casca do Caule de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae) / Maraiza Gregorio de Oliveira. Crato-CE, 2024.

57p. il.

Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais da Universidade Regional do Cariri - URCA.

Orientador(a): Prof. Dr. Luiz Marivando Barros

1.Bactérias multirresistentes, 2.Janaguba, 3.Antibióticos, 4.Resistência aos Antimicrobianos, 5.Bioprospecção; I.Título.

CDD: 577

MARAIZA GREGORIO DE OLIVEIRA

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
ANTIMICROBIANO E DA TOXICIDADE DE EXTRATOS DA CASCA DO CAULE  
DE *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (APOCYNACEAE)**

Dissertação do Mestrado em Diversidade Biológica e Recursos Naturais apresentada à  
Universidade Regional do Cariri – URCA, para obtenção do título de Mestre(a) em  
Diversidade Biológica e Recursos Naturais.

**APROVADO(A) EM:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Luiz Marivando Barros (**Orientador/Presidente**)  
Universidade Regional do Cariri (URCA)

---

Prof. Dr. Raimundo Nonato Pereira Teixeira (**Membro Interno**)  
Universidade Regional do Cariri (URCA)

---

Prof. Dr. José Weverton Almeida Bezerra (**Membro Externo**)  
Universidade Federal de Pernambuco

Esse trabalho é dedicado aos meus pais **Luzinete Gregorio e Cicero Pedro**,  
por me permitirem ter a chance que vocês não tiveram.

Essa conquista não é só minha, é de vocês também.

Vocês são a minha base.

Amo muito vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir ter uma vida abençoada e cheia de luz e esperança.

Agradeço a meus pais, Luzinete Gregorio e Cicero Pedro, por sempre terem me guiado e incentivado na busca por todas as minhas conquistas. Vocês sempre foram e sempre serão minha inspiração. Sou imensamente grata, por terem me permitido e me proporcionado ter as oportunidades que vocês não tiveram. Amo vocês infinitamente.

Aos meus irmãos Marciano, Marcelo e Marcos, muito obrigado por me apoiarem nas minhas escolhas e estarem ao meu lado durante toda essa jornada.

A minha cunhada Ana Cristina, por me apoiar e sempre ouvir meus desabafos, sou grata por tê-la no meu dia a dia.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Marivando Barros, muito obrigado por todos os conselhos, sugestões e ensinamentos. Sou muito grata pela oportunidade e por tudo.

Aos meus colegas do Laboratório de Ecofisiologia (LECOV) e Biologia e Toxicologia (BIOTOX), em especial a Adrielle, Jailson, Alonso e Ellayne.

Ao pessoal do LMBM e do LPPN, ao Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho e ao Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa, vocês são pesquisadores exemplares, obrigado pela parceira científica e por manter as portas do laboratório sempre abertas.

Ao pessoal do LMAC e a Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga, por ser esse ser de luz, que sempre tem um abraço quentinho e palavras de incentivo para dar. Gratidão por todo o apoio.

Ao Prof. Dr. José Weverton Almeida e a Prof<sup>a</sup>. Me. Adrielle Rodrigues por terem me guiado durante essa trajetória, aprendi muito com vocês e sou muito grata por todos os conselhos e ensinamentos! Vocês são profissionais incríveis!

Aos meus velhos amigos Leice, Joice, Cicero, Tayrones e Yasminy e a meus novos amigos Weverton, Rafael, Adrielle, Bruno e Viviane. Obrigada por tornarem essa caminhada mais leve!

Ao Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais e todos aqueles que o compõem, aos docentes, discentes e especialmente ao Coordenador Prof. Dr.

Fábio Yamada e a secretária Francly Brito, por todo o auxílio prestado com dedicação, zelo e competência.

A banca examinada, Prof. Dr. Raimundo Nonato Pereira Teixeira, Prof. Dr. José Weverton Almeida Bezerra, Dr<sup>a</sup>. Felicidade Caroline Rodrigues e ao Prof. Dr. Antônio Álamo Feitosa Saraiva, pelas valiosas sugestões e considerações para aprimoramento do trabalho.

A CAPES e a URCA, pelo suporte financeiro e técnico concedido a esta pesquisa.

## RESUMO

A resistência microbiana causada pela propagação de microrganismos resistentes devido ao uso indevido de antibióticos, se tornou um grave problema de saúde pública, causando milhões de morte em escala mundial nos últimos anos. Devido a essa problemática a busca por compostos oriundos de plantas medicinais com atividade biológica ou com efeito potencializador dos fármacos já existentes, que sejam capazes de driblar essa resistência bacteriana se tornou frequente e de grande importância. Nesse contexto, a espécie *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, é bastante empregada por moradores da Chapada do Araripe para fins medicinais, que utilizam o látex, folhas e cascas com o objetivo de tratar várias enfermidades como: as doenças infecciosas, doenças do sistema digestivo e doença do sistema geniturinário. Assim, o objetivo desse estudo foi determinar a composição fitoquímica dos extratos metanólico e hexânico da casca do caule de *H. drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae) e avaliar o seu efeito antibacteriano e potencializador de fármaco, bem como analisar sua toxicidade *in vivo* e *in vitro*. Para isso, foi realizada a prospecção fitoquímica através de técnicas colorimétricas para a análise qualitativa da presença de diversas classes de compostos químicos dos extratos. Nos testes antibacterianos, foi determinada a CIM dos extratos contra cepas padrões e multirresistentes de *Staphylococcus aureus* (SA ATCC 25923, SA 10), *Escherichia coli* (EC ATCC 25922, EC 06) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA ATCC 9027, PA 24) e efeito potencializador em associação com gentamicina, oxacilina e norfloxacina. Já a Toxicidade foi avaliada pela taxa de mortalidade e geotaxia negativa das moscas *Drosophila melanogaster*, além de teste de letalidade com *Artemia salina*. Os resultados demonstram que dos nove metabólitos secundários identificados nos extratos, cinco são da subclasse dos flavonoides. Nos ensaios antibacterianos, os extratos não apresentam efeito direto contra as cepas testadas, no entanto em combinação com a norfloxacina, ambos os extratos potencializaram a ação da droga, reduzindo sua CIM contra *S. aureus* ( $p < 0,0001$ ). Houve também a redução da ação da oxacilina para *E. coli* e *S. aureus* quando combinado com o extrato metanólico. Sendo observado ainda que o extrato hexânico reduziu a ação da gentamicina e norfloxacina, demonstrando um aumento na média geométrica da CIM contra *P. aeruginosa*. Quanto a citotoxicidade o extrato metanólico não foi tóxico quando comparado com o grupo controle, enquanto que no extrato hexânico foi evidenciada uma leve toxicidade nas concentrações de 100 e 250 µg/mL, porém com CL<sub>50</sub> acima de 1000 µg/mL, considerando-se de baixa toxicidade. Portanto, os extratos hexânico e metanólico de *H. drasticus* apresentam potencial farmacológico quando usados em associação com determinados fármacos frente bactérias patogênicas, além de serem considerados seguros quando ao uso, devido à baixa toxicidade observada.

**Palavras-chaves:** Bactérias multirresistentes. Janaguba. Antibióticos. Resistência aos Antimicrobianos. Bioprospecção.

## ABSTRACT

Microbial resistance caused by the spread of resistant microorganisms due to the misuse of antibiotics has become a serious public health issue, causing millions of deaths worldwide in recent years. Due to this problem, the search for compounds derived from medicinal plants with biological activity or with a potentiating effect on existing drugs, which are capable of overcoming this bacterial resistance, has become frequent and highly important. In this context, the species *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel is widely used by residents of Chapada do Araripe for medicinal purposes. They use the latex, leaves, and bark to treat various ailments such as infectious diseases, digestive system diseases, and genitourinary system diseases. Thus, the aim of this study was to determine the phytochemical composition of the methanolic and hexane extracts from the stem bark of *H. drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae) and to evaluate its antibacterial and drug-enhancing effects, as well as to analyze its toxicity *in vivo* and *in vitro*. To this end, phytochemical screening was performed using colorimetric techniques for the qualitative analysis of the presence of various classes of chemical compounds in the extracts. In the antibacterial tests, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracts was determined against standard and multi-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (SA ATCC 25923, SA 10), *Escherichia coli* (EC ATCC 25922, EC 06), and *Pseudomonas aeruginosa* (PA ATCC 9027, PA 24), and the potential enhancing effect in combination with gentamicin, oxacillin, and norfloxacin. Toxicity was assessed by the mortality rate and negative geotaxis of *Drosophila melanogaster* flies, as well as a lethality test with *Artemia salina*. The results show that of the nine secondary metabolites identified in the extracts, five belong to the flavonoid subclass. In the antibacterial assays, the extracts did not exhibit direct effects against the tested strains, however, when combined with norfloxacin, both extracts enhanced the drug's action, reducing its MIC against *S. aureus* ( $p < 0.0001$ ). Additionally, there was a reduction in the action of oxacillin against *E. coli* and *S. aureus* when combined with the methanolic extract. It was also observed that the hexane extract reduced the action of gentamicin and norfloxacin, demonstrating an increase in the geometric mean of the MIC against *P. aeruginosa*. Regarding cytotoxicity, the methanolic extract was not toxic compared to the control group, while the hexane extract showed slight toxicity at concentrations of 100 and 250  $\mu\text{g/mL}$ , but with an  $\text{CL}_{50}$  above 1000  $\mu\text{g/mL}$ , indicating low toxicity. Therefore, the hexane and methanolic extracts of *H. drasticus* exhibit pharmacological potential when used in combination with certain drugs against pathogenic bacteria, and are considered safe for use due to the low toxicity observed.

**Keywords:** Bacterial resistance. Janaguba. Antibiotics. Antimicrobial resistance.

Bioprospecting.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Principais mecanismos de defesa das bactérias frente a antibióticos.....19
- Figura 2.** *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel; A: Flor; B: Hábito; C: Látex; D: Fruto; E: Caule.....26
- Figura 3.** Efeito de modulação do Extrato Metanólico de *Himatanthus drasticus* (EMHD) em associação com gentamicina, oxacillina e norfloxacino contra *Pseudomonas aeruginosa* 24, *Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli* 06. Controle refere-se a antibiótico-isolado. \*\*\*\* valor estatisticamente significativo quando  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , não estatisticamente significativo (ns) quando  $p > 0,05$ .....38
- Figura 4.** Efeito de modulação do Extrato Hexânico de *Himatanthus drasticus* (EHHD) em associação com gentamicina, oxacillina e norfloxacino contra *Pseudomonas aeruginosa* 24, *Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli* 06. Controle refere-se a antibiótico-isolado. \*\*\*\* valor estatisticamente significativo quando  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , não estatisticamente significativo (ns) quando  $p > 0,05$ .....38
- Figura 5.** Porcentagem de sobrevivência de *Drosophila melanogaster* expostas a diferentes concentrações de extratos durante 7 dias de exposição. A: Extrato Metanólico de *Himatanthus drasticus* (EMHD). B: Extrato Hexânico de *H. drasticus* (EHHD). Não estatisticamente significativo (ns) quando  $p > 0,05$ ..... 39
- Figura 6.** Porcentagem de danos ao aparelho locomotor (geotaxia negativa) de *Drosophila melanogaster* expostas a diferentes concentrações de Extrato. A: Extrato Metanólico de *Himatanthus drasticus* (EMHD). B: Extrato Hexânico de *H. drasticus* (EHHD). Não estatisticamente significativo (ns) quando  $p > 0,05$ .....40
- Figura 7.** Porcentagem de Mortalidade de *Artemia salina*. A: Extrato Metanólico de *Himatanthus drasticus* (EMHD). B: Extrato Hexânico de *H. drasticus* (EMHD). Os valores foram calculados como porcentagens relativas no controle vivo, N=3. \*\*\*\* valor estatisticamente significativo  $p < 0,0001$ , quando comparada ao controle dicromato de potássio; ##### valor estatisticamente significativo  $p < 0,0001$ , quando comparada ao controle negativo; não estatisticamente significativo (ns) quando  $p > 0,05$ .....41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Substâncias identificadas em <i>Himatanthus drasticus</i> .....	27
<b>Tabela 2.</b> Métodos de determinação fitoquímica qualitativa do Extrato Metanólico de <i>H. drasticus</i> (EMHD) e Extrato Hexânico <i>H. drasticus</i> (EHHD) .....	32
<b>Tabela 3.</b> Prospecção fitoquímica do Extrato Metanólico de <i>Himatanthus drasticus</i> (EMHD) e Extrato Hexânico <i>H. drasticus</i> (EHHD).....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Análise de Variância

APA: Área de Proteção Ambiental

ATCC: American Type Culture Collection

BHI: Brain Heart Infusion Broth

CIM: Concentração Inibitória Mínima

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

HCDAL: Herbário Caririense Dárdaro de Andrade Lima

HEHD: Hexanic Extract of *Himatanthus drasticus*

HIA: Heart Infusion Ágar

EHHD: Extrato Hexânico de *Himatanthus drasticus*

EMHD: Extrato Metanólico de *Himatanthus drasticus*

MEHD: Methanolic extract of *Himatanthus drasticus*

OMS: Organização Mundial da Saúde

RAM: Resistencia aos Antimicorbianos

SISBio: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

URCA: Universidade Regional do Cariri

## LISTA DE SÍMBOLOS

%: Porcentagem

-: Menos

+: Mais

<: Menor que

=: Igual

>: Menor que

≥: Maior ou igual que

CFU/mL: Curva de crescimento da colônia Escherichia coli por mililitro

CL<sub>50</sub>: 50% de concentração letal

g: Gramas

h: Horas

IC<sub>50</sub>: Concentração Inibitória Média

mg: Miligramas

mL: Mililitro

N: Número

°C: Graus Celsius

v/v: volume de soluto pelo volume da solução  
μg/mL: Microgramas de soluto por mililitro de solvente

μg: Microgramas

μL: Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>177</b>
2.1 Resistência microbiana.....	17
2.2 Toxicidade.....	20
2.3 Bioprospecção e Uso Sustentável da Biodiversidade .....	20
2.4 Plantas Medicinais da Chapada do Araripe.....	23
2.5 Família Apocynaceae .....	24
2.6 <i>Himatanthus drasticus</i> .....	25
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 Material botânico .....	31
3.2 Preparação dos extratos .....	31
3.3 Prospecção fitoquímica.....	31
3.4 Testes antibacterianos .....	333
3.4.1 Antibióticos, meios de cultura e cepas bacterianas.....	333
3.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	333
3.4.3 Avaliação da Atividade Intensificadora de Fármacos.....	344
3.5 Teste de mortalidade com <i>Drosophila melanogaster</i> e teste de desempenho locomotor .....	Erro! Indicador não definido.4
3.6 Teste de letalidade com <i>Artemia salina</i> .....	Erro! Indicador não definido.5
3.7 Análise estatística .....	35
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 Prospecção fitoquímica.....	36
4.2 Atividade antibacteriana e efeito modificador na ação fármaco. Erro! Indicador não definido.	
4.3 Atividade tóxica e geotaxia negativa utilizando <i>Drosophila melanogaster</i> .....	379
4.4 Atividade toxicológica usando <i>Artemia salina</i> .....	411
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>477</b>
<b>ANEXO A: COMPROVANTE DE SUMISSÃO DE ARTIGO DA DISSERTAÇÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>ANEXO B: COMPROVANTE DE QUALIS VIGENTE NA ÁREA DE BIODIVERSIDADE</b> .....	<b>57</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos (RAM) se dá pela redução da capacidade de microrganismos tais como bactérias e fungos vírus e protozoários responderem a agentes antimicrobianos (WHO, 2023). Isto ocorre devido a capacidade evolutiva e adaptativa desses microrganismos, que quando expostos a estes medicamentos, passam por alterações genéticas, resultando na gradual diminuição da sensibilidade a múltiplos fármacos que antigamente eram eficazes (Oliveira *et al.*, 2021). Considerada como uma das principais ameaças à saúde pública em escala global, a RAM é apontada como um enorme desafio clínico no tratamento de infecções, e essa problemática têm se agravado devido ao uso indiscriminado de antibióticos (Bezerra *et al.*, 2019).

Dentre as bactérias de grande interesse, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* representam exemplos de agentes bacterianos associados a mortes relacionadas à RAM, pois possuem mecanismos de resistência que os tornam refratários a uma variedade de fármacos convencionais disponíveis (Reza; Sutton; Rahman, 2019; Murray *et al.*, 2022; Haindongo *et al.*, 2023). Esses patógenos exibem uma elevada capacidade de patogenicidade e virulência, contribuindo para o desenvolvimento de quadros clínicos severos (Denamur *et al.*, 2021; Freitas *et al.*, 2022). Nesse contexto, pesquisas recentes indicam que o aumento e a disseminação da RAM têm impulsionado investigações em busca de alternativas seguras e eficazes, bem como de abordagens que possam potencializar a eficácia dos fármacos existentes (Abd Ellah *et al.*, 2019; Abd El-Baky *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o uso de plantas com fins terapêuticos é uma prática antiga e de importante relevância, pois apresentam ampla atividade farmacológica e biológica contra diversas doenças, apresentando também baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais (Anand *et al.*, 2020). Esses efeitos terapêuticos observados estão ligados à diversidade fitoquímica proveniente do metabolismo secundário desses vegetais. Como resultado, esses produtos emergem como perspectivas promissoras para as indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, enfrentando desafios relacionados à resistência microbiana. (Buffé; Araújo; Costa, 2001; Kumar; Khan; Saikia, 2019).

Contudo, o uso desordenado de espécies vegetais sem o entendimento da toxicidade da espécie, vem gerando uma enorme preocupação para a área da saúde. Desta forma, indicam-se análises da toxicidade de plantas usadas na alimentação e na medicina popular, visto que colaboram para a sistematização de produtos fitofarmacêuticos e alimentícios (Salehi *et al.*, 2020).

Assim, tendo em vista a ampla gama de espécies de plantas medicinais da flora brasileira, os gêneros pertencentes a família Apocynaceae destacam-se por possuírem considerável importância medicinal, por causa da sua composição química rica em alcaloides, terpenoides, flavonoides, fenóis simples, hidrocarbonetos e lactonas. O que lhes confere importantes atividades biológicas e contribui para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas através da prospecção de seus metabólitos secundários (Bhadane *et al.*, 2018; Anand *et al.*, 2020; Melo; Bonilla; Lucena, 2021).

Dentre os integrantes dessa família, destaca-se a *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, conhecida popularmente como janaguba. Essa espécie é amplamente empregada por moradores da Chapada do Araripe por apresentar importante uso etnomedicinal no tratamento de infecções intestinais, herpes, gastrites e febre e (Bitu *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2015). Das partes utilizados da árvore, se destacam o látex, a casca e as folhas, os quais indicam grande potencial bioativo, conforme tem sido exposto na literatura em estudos de avaliação da atividade antimicrobiana (Nascimento *et al.*, 2018; Figueiredo *et al.*, 2017).

Nesse contexto, sendo a espécie *H. drasticus* membro da família Apocynaceae, que é reconhecida por possuir fitoconstituintes que apresentam significativas atividades biológicas, torna-se relevante a investigação da composição fitoquímica e como esses componentes podem estar associados a bioatividades, permitindo assim uma melhor identificação do potencial antibacteriano da espécie. Podendo ainda fornecer subsídios para a descoberta de novos fármacos e auxiliar no combate de microrganismos patogênicos resistentes.

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e potencializadora dos extratos metanólico e hexânico da casca do caule de *H. drasticus* bem como sua toxicidade *in vivo* utilizando a *Drosophila melanogaster*, avaliando sua taxa de mortalidade, geotaxia e *in vitro* usando o modelo *Artemia salina*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Resistência aos antimicrobianos

Desde que foram identificados, os medicamentos antimicrobianos têm desempenhado um papel crucial na promoção da saúde humana e têm sido essenciais para a melhoria da qualidade de vida. Porém, os médicos frequentemente fazem uso inadequado desses agentes antimicrobianos, que estão entre os medicamentos mais amplamente utilizados. Assim, o uso indiscriminado e excessivo de antibióticos tem levado ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana e ao surgimento de cepas multirresistentes (RAM) em patógenos, alcançando níveis alarmantes em várias regiões do mundo, especialmente em países em desenvolvimento (Ayukekbong; Ntemgwa; Atabe, 2017).

Os antibióticos são compostos de origem natural ou sintética cuja função primordial é enfrentar infecções provocadas por microrganismos, atuando em alvos microbianos específicos, como a parede celular, a síntese de proteínas e a síntese de ácidos nucleicos, entre outros mecanismos. Para enfrentar tais ataques específicos, as bactérias criam estratégias de resistência aos antimicrobianos. Esse processo ocorre quando a bactéria desenvolve diferentes mecanismos para neutralizar a ação do antibiótico, normalmente por meio de mutações no DNA ou pela transferência de plasmídeos (Scaldaferri *et al.*, 2020)

Há várias classes químicas de antibióticos, que podem ser organizadas conforme seu alvo específico dentro da célula bacteriana. Estas incluem: Inibidores da síntese de parede celular (Penicilinas, Cefalosporinas e Polipeptídicos); inibidores da síntese proteica (Aminoglicosídeos, Pleuromutilinas, Tetraciclina, Macrolídeos, Estreptograminas, Oxazolidinonas e Gliciliclinas); danos à membrana plasmática (Lipopeptídeos); inibidores da síntese de ácidos nucleicos (Rifamicinas, Quinolonas e fluoroquinolonas) e inibidores competitivos da síntese de metabólitos essenciais (Sulfonamidas) (Tortora; Funke; Case, 2017).

Para Spellberg (2016), a resistência aos antibióticos (RAM) é sem dúvida um dos principais desafios do século XXI por todas as principais entidades econômicas, políticas e regulatórias, incluindo o Fundo Monetário Internacional (FMI), o Banco Mundial (BM), a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Grupo dos Oito (G8). A RAM apresenta os maiores problemas e desafios, representando uma ameaça significativa à saúde pública (por meio da falha da quimioterapia), preocupações e crises sociais, de saúde animal e ambientais, constituindo, portanto, um grave problema mundial.

Existem diversos motivos pelos quais o uso indiscriminado de antibióticos é observado, incluindo prescrições inadequadas, seja por falta de necessidade ou pela escolha de medicamentos de amplo espectro, juntamente com períodos e doses incorretos, que poderiam ser ajustados de acordo com a situação específica do paciente. Outro fator que também contribui para esse cenário é a falta de comunicação médico/paciente, levando a tratamentos que poderiam ser breves a se tornarem problemas, às vezes até mesmo irreversíveis (Estrela, 2018).

A resistência bacteriana pode ter seus mecanismos desenvolvidos de maneira intrínseca e adquirida. (Abrantes; Nogueira, 2021; Dalmolin *et al.*, 2022). A resistência intrínseca ou natural é aquela que é geneticamente transmitida, ou seja, possui características morfológicas e enzimáticas que conferem naturalmente sua resistência a um antibiótico específico, e faz parte das características inatas da bactéria. Já a resistência "adquirida", como o termo indica, é desenvolvida por influências externas, por meio de mutações genéticas que reduzem a sensibilidade aos medicamentos ou pela transferência horizontal de genes. (Munita; Arias, 2016, Oliveira *et al.*, 2020).

Devido à diversidade de mecanismos de ação dos antibióticos, as bactérias desenvolveram várias estratégias de resistência. Em geral, a resistência bacteriana aos antibióticos pode acontecer de três formas: 1) mudanças na permeabilidade da membrana celular, que podem bloquear a entrada do antibiótico na célula ou permitir que o antibiótico seja expelido da célula (por efluxo ativo); 2) aquisição da capacidade de degradar ou inativar o antibiótico; ou 3) o surgimento de mutações que alteram o alvo de um antibiótico, tornando-o ineficaz (Lima; Benjamim; Santos, 2017).

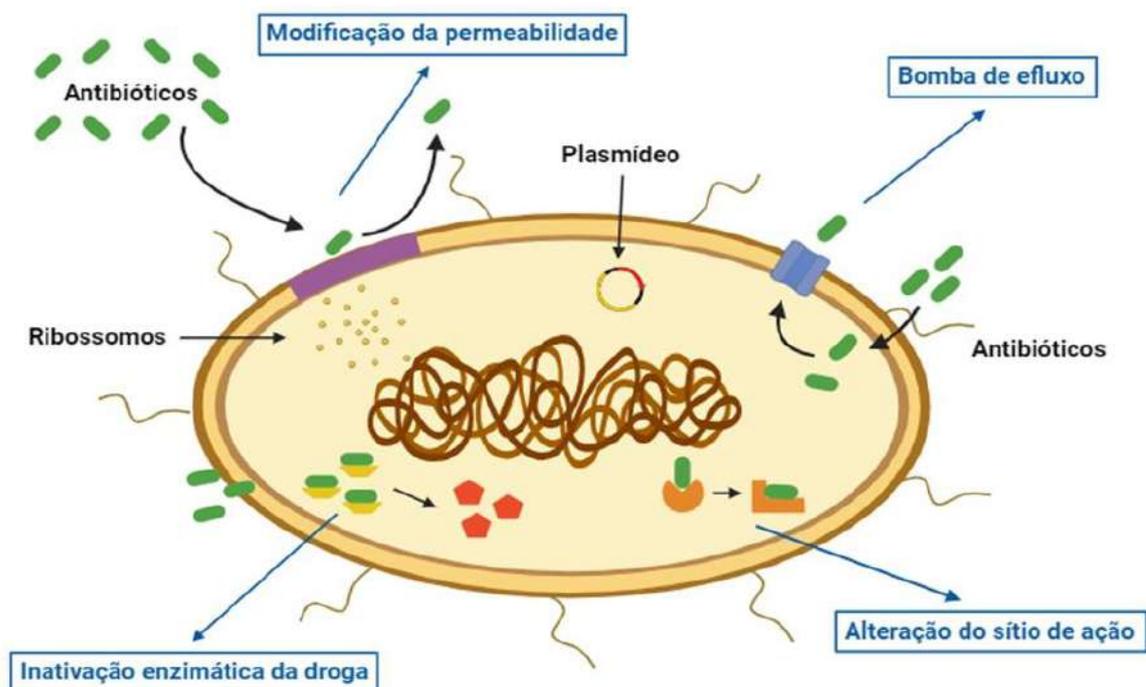
Os genes responsáveis pela resistência aos antibióticos modernos estão presentes nas bactérias há séculos ou milênios. Para obtenção de resistência aos antibióticos ocorre uma dinâmica troca de material genético entre as bactérias, ocorrendo mesmo entre aquelas de diferentes espécies, assim como entre bactérias vivas e inativas. Essa troca genética ocorre por meio de mecanismos como a conjugação (que envolve a transferência de plasmídeos e transpósons por contato direto entre as bactérias, ou pela transmissão de cópias genéticas por estruturas semelhantes a agulhas), transdução (onde a troca de material genético é mediada por vírus bacteriófagos) e transformação (na qual a bactéria adquire DNA exógeno do meio ambiente, inclusive de outras bactérias já mortas (Khan; Miller; Arias, 2018).

A resistência aos antibióticos surge por meio de características genéticas preexistentes, transmitidas entre as bactérias por diversos mecanismos, podendo se destacar quatro categorias principais: primeiro a atividade de bombas de efluxo, segundo mudanças na composição da membrana célula, alterando a permeabilidade, terceiro através de mutações que podem impedir

a entrada de antibióticos devido alterações no sítio de ação do antibiótico, e por último produzindo inativadores enzimáticos (Figura 1) (Costa & Silva Junior, 2017; Bello; Dingle, 2018).

Segundo Silveira *et al.* (2006), cepas patogênicas têm sido capazes de resistir a antibióticos altamente eficazes de diversas classes químicas por meio da utilização desses mecanismos isoladamente ou em conjunto. Os níveis de resistência entre patógenos bacterianos comuns são alarmantes, exemplo disso, são as taxas médias relatadas em 76 países, de 42% para *Escherichia coli* (EC) resistente à cefalosporina de terceira geração e 35% para *Staphylococcus aureus* (SA) resistente à metilina, representam uma preocupação significativa (WHO, 2022).

**Figura 1.** Principais mecanismos de defesa das bactérias frente a antibióticos.



Segundo estatísticas, aproximadamente 700.000 pessoas morrem anualmente devido a infecções relacionadas a resistência antimicrobiana, e estima-se que esse número aumentará para 10 milhões por ano até 2050 em nível global. Esses números são considerados alarmantes e reafirmam a urgência na busca por novos antimicrobianos. Porém, considerando que os antibióticos tradicionais ainda são eficazes no tratamento de várias infecções, o foco principal dos novos agentes terapêuticos é enfrentar agentes patogênicos multirresistentes e fornecer uma vantagem preventiva contra condições patogênicas emergentes, o que amplia a busca pela

medicina complementar e alternativa, visto que a mesma possui capacidade de oferecer tratamentos com menos efeitos colaterais, amplo espectro de atividade contra diversas doenças, alta tolerabilidade, baixo nível de toxicidade, custo mais acessível e uma farmacocinética que permite eficácia clínica sem a necessidade de alterações químicas (Anand *et al.*, 2020).

## 2.2 Toxicidade

O uso de produtos fitoterápicos vem crescendo significativamente na população nos últimos tempos, devido ao seu uso ser considerado seguro. Entretanto, é indispensável a realização de bioensaios como forma de verificar efeitos adversos e toxicidade do material vegetal utilizado na produção desses fitoterápicos. Portanto, é crucial implementar um controle de qualidade rigoroso para avaliar e equilibrar a segurança, eficácia e validade do uso de plantas medicinais, em relação aos possíveis riscos associados à sua composição química (Başaran; Pasli; Başaran, 2022).

Os estudos toxicológicos pré-clínicos são de fundamental importância no desenvolvimento de novos fitoterápicos, uma vez que possibilitam a verificação antecipada de riscos e, assim, a minimização dos efeitos adversos e prejudiciais aos seres humanos. Esses estudos podem ser realizados através de testes *in vitro* e *in vivo*. Sendo que os testes *in vitro* têm ganhado significativa ênfase devido à pressão social para reduzir o uso de animais na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. Entretanto, são os ensaios *in vivo* que fornecem esclarecimentos mais precisos sobre a segurança e eficácia dos novos fármacos (Knop & Maria, 2016).

Tendo em vista que a toxicidade dos compostos é um dos principais problemas em todas as etapas do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, os ensaios de toxicidade se tornaram de extrema importância para a produção de novos fármacos. O que tem favorecido cada vez mais o entendimento da relação dose-resposta e seus efeitos sobre o ser humano. Uma vez que um ensaio toxicológico engloba uma ampla análise da uma substância em questão, fornecendo informações que confirmem ou não a segurança de seu uso (Silva *et al.*, 2021).

Nesse sentido, o uso do organismo modelo *Drosophila melanogaster*, para testes de toxicidade *in vivo*, se destaca como uma alternativa promissora e viável, visto que não necessitam da submissão ao comitê de ética, são de fácil manuseio e possuem resultados precisos. Esses organismos possuem um ciclo de vida rápido e sua manutenção é de baixo custo em laboratórios, além de seu genoma ser significativamente homólogo ao dos humanos.

Portanto, já possuem ensaios bastante estabelecidos na literatura, como é o caso do teste de escalada e de geotaxia negativa. Sendo bastante empregados para investigação de toxicidade em estudos de espécies vegetais com potencial bioativo (Bernardes *et al.*, 2023).

Já para ensaios de toxicidade *in vitro*, o microcrustáceo de água salgada *Artemia salina* é um modelo frequentemente utilizado, devido a sua facilidade de manuseio e baixo custo. Essa espécie é apta para esse tipo de ensaio, por possuir pouca tolerância a mudanças ambientais e alta sensibilidade a interferências externas, o que assegura resultados mais objetivos até mesmo para mínimas variações na qualidade do ambiente. Deste modo, os ensaios de toxicidade aguda permitem a determinação através da Concentração Letal para 50% da população teste (CL50) de compostos bioativos em extratos vegetais. Assim, esse bioensaio preliminar é apontado como essencial na avaliação de substâncias com potencial atividade biológica, além de ser bastante reconhecido pela comunidade científica (Lima *et al.*, 2019).

### **2.3 Bioprospecção e Uso Sustentável da Biodiversidade**

A biodiversidade ou diversidade biológica é o termo utilizado para representar a variedade de elementos ecológicos cruciais que englobam uma variedade de escalas espaciais, desde os níveis genéticos até as espécies e comunidades (Cain; Bowman; Hacker, 2018). Portanto a diversidade biológica refere-se à variabilidade dos seres vivos em todas as suas formas, incluindo os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ambientes aquáticos, assim como os complexos ecológicos dos quais fazem parte. Isso abrange a diversidade presente dentro das espécies, entre as espécies e nos ecossistemas como um todo (Brasil, 1998).

O Brasil é conhecido globalmente por conter a mais rica biodiversidade do planeta, abrigando cinco biomas continentais importantes, a mais abundante diversidade de vida continental do planeta, com uma proporção significativa de espécies endêmicas, além de possuir de 15% e 20% de toda a diversidade biológica do mundo, incluindo a maior floresta tropical, a Amazônia, e dois dos dezenove *hotspots* mundiais, a Mata Atlântica e o Cerrado (Prates; Irving, 2015).

Para Ribeiro *et al.* (2019), dado esse status de país da megadiversidade, o Brasil tem um compromisso significativo no que diz respeito à compreensão, aplicação e preservação da biodiversidade. Isso implica levar em consideração os valores fundamentais da vida, os serviços ecossistêmicos associados e sua interação com as perspectivas de bem-estar social, além das oportunidades de impulsionar o desenvolvimento econômico sustentável por meio desse conhecimento.

Partindo dessa premissa, no ano de 1999, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) fundou o Programa de Pesquisa em Caracterização, Conservação, Restauração e Uso Sustentável da Biodiversidade (BIOTA-FAPESP), com o propósito principal de cartografar e examinar a biodiversidade de microrganismos, animais e plantas no Estado de São Paulo, além de promover o desenvolvimento de produtos naturais com valor agregado, que possam impulsionar a bioeconomia em nível regional e em uma escala mais ampla (FAPESP, 2022). Os resultados de alta qualidade desde o início do BIOTA-FAPESP inspiraram a criação de iniciativas similares por agências federais de financiamento à pesquisa. Como é o caso do Programa SISBIOTA, apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) em parceria com várias agências estaduais de fomento à pesquisa, estabelecido em 2010. Essa iniciativa promoveu a colaboração entre diferentes grupos de pesquisa de produtos naturais em todo o Brasil, facilitando a otimização dos recursos e equipamentos disponíveis, além de um impacto positivo nas comunidades locais, que detêm conhecimento tradicional, por meio da partilha dos benefícios provenientes da exploração sustentável da biodiversidade, seguindo os princípios da bioeconomia (Silva *et al.*, 2022).

Tendo em vista a relevância do Brasil na importância global da conservação da biodiversidade. Nas áreas de conservação onde a interação humana é autorizada, o conhecimento tradicional pode desempenhar um papel crucial no planejamento ambiental, na proteção das espécies e na promoção do desenvolvimento sustentável. Assim, o conhecimento tradicional emerge como uma ferramenta eficaz para o planejamento e proteção dessas regiões, enriquecendo a ciência ao fornecer abordagens práticas fundamentadas na compreensão dos ecossistemas, contribuindo para a compreensão das mudanças ambientais (Borges; Peixoto, 2009; Brito; Marín; Cruz, 2017).

A bioprospecção pode ser definida como é uma busca sistêmica por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e componentes originários de seres vivos em geral, conhecidos coletivamente como recursos genéticos, que tenham o potencial de contribuir para o desenvolvimento de um produto. Que se destaca pelo seu potencial no desenvolvimento de novos medicamentos obtidos diretamente ou indiretamente de produtos naturais (Mateo; Nader; Tamayo, 2001).

Atualmente, o mercado de fitoterápicos está em crescimento contínuo, impulsionado pela ampla diversidade de aplicações dos extratos e compostos bioativos provenientes de plantas com propriedades terapêuticas, que se caracterizam por possuírem princípios ativos que podem ser empregados na formulação de produtos relacionados a uma variedade de respostas farmacológicas e biológicas, como efeitos anti-inflamatórios, cicatrização de feridas,

Oliveira, M.G., Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da casca do caule de *Himatanthus drasticus* (mart.) plumel (Apocynaceae)

alívio de dores, tratamento de doenças parasitárias, redução de inflamações, combate à anemia, e propriedades antibacterianas (Pedrollo *et al.*, 2016; Silva; Oliveira, 2017; Efferth *et al.*, 2021).

Portanto, é fundamental a elaboração de estratégias de conservação e promoção de pesquisas com espécies nativas, a fim de substituir a pressão causada pelo extrativismo por práticas de manejo sustentável, de modo que os estudos relacionados ao uso de plantas na produção de medicamentos, à análise da composição química das espécies nativas, à investigação de suas potenciais atividades biológicas, e a diversidade de espécies possa ser explorada como uma fonte de oportunidades sustentável (Stehmann; Sobral, 2017; Silva; Dotto; Rebelo, 2022)

## **2.4 Plantas Medicinais da Chapada do Araripe**

A Chapada do Araripe, localizada no extremo Sul do Ceará (abarcando ainda os estados de Pernambuco e Piauí) a qual é conhecida por abrigar uma alta quantidade de angiospermas ao longo de suas fitofisionomias, como a Savana (Cerrado); Savana Estépica (Carrasco) e Floresta Estacional Sempre-Verde (Floresta úmida) (Sousa *et al.*, 2021; Ribeiro-Silva *et al.*, 2012). Conta com duas unidades de conservação que desempenham um papel fundamental na proteção das fontes naturais, da flora e fauna locais: a Área de Preservação da Chapada do Araripe (APA-Araripe) e a Floresta Nacional do Araripe-Apodi (Flona Araripe-Apodi) (Moro *et al.*, 2015). Devido esta diversidade biológica vegetal, tal área é objeto constante de estudos etnofarmacológicos, os quais demonstraram o alto potencial etnomedicinal das espécies lá encontradas (Cruz *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2014; Macêdo *et al.*, 2018; Macêdo *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2012).

Na Floresta Nacional do Araripe-Apodi, o uso de plantas medicinais para tratar doenças é um dos principais recursos naturais disponíveis para as comunidades que vivem na região (Crepaldi *et al.*, 2016; Sousa-Júnior *et al.*, 2016; Fernandes *et al.*, 2020). Considera-se como planta medicinal qualquer tipo de vegetal que contenha substâncias em um ou mais de seus órgãos que possam ser empregadas para propósitos terapêuticos ou que sirvam como precursores de fármacos semissintéticos. O uso de plantas medicinais na promoção e restauração da saúde tem sido praticado desde os primórdios da civilização, empregando-se métodos simples de administração, como a preparação de chás, decocções, infusões e macerados (De Souza *et al.*, 2019) Assim, a compreensão das propriedades terapêuticas, manuseio e toxicidade desses vegetais é motivo de grande interesse nos estudos científicos, uma vez que essas investigações possibilitam a compreensão da eficácia e da viabilidade desses

Oliveira, M.G., Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da casca do caule de *Himatanthus drasticus* (mart.) plumel (Apocynaceae)

produtos naturais, oferecendo alternativas e recomendações científicas seguras para o tratamento de algumas doenças (Gomes *et al.*, 2018; Rempel *et al.*, 2019).

Buscando compreender a medicina tradicional local e suas estruturas organizacionais de conhecimento, bem como identificar plantas com potencial terapêutico, abrindo caminho para a descoberta de novos tratamentos medicinais, estudos etnobotânicos são realizados em todo o Brasil (Coutinho; Travassos; Amaral, 2002). Nesse contexto, segundo o estudo de Cruz *et al.* (2021) até o dado momento, foram registradas 92 espécies ocorrentes na Chapada do Araripe com valor etnomedicinal. Estas estão distribuídas em 44 famílias botânicas, sendo a mais representativa Fabaceae (Macêdo *et al.*, 2018). Contudo, além desse táxon, há outros de grande interesse na medicina popular, como por exemplo Apocynaceae, a qual apresenta 12 espécies para a região, das quais se destacam as espécies *Asclepias curassavica* L., *Hancornia speciosa* Gomes, *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, *Mandevilla scabra* (Hoffmanns. ex Roem. & Schult.) K.Schum., *Rauvolfia paucifolia* A.DC, *Secondatia floribunda* A.DC. e *Temnadenia violacea* (Vell.) Miers, na Chapada do Araripe (Ribeiro *et al.*, 2014).

## 2.5 Família Apocynaceae

A família botânica Apocynaceae está entre as dez maiores famílias de angiospermas, englobando 378 gêneros e mais de 5.000 espécies (Endress *et al.*, 2018; Wang, 2023). Foi identificada por Jussieu, em *Genera Plantarum* (1798), como Apocineae, e classificada na ordem Gentianales e subclasse Asteridae (Rapini 2012; Endress; Liede-Schumann; Meve, 2014). Segundo a Flora e funga do Brasil (2022), o número de espécies nativas de Apocynaceae no Brasil é representado por 91 gêneros, 808 espécies, 10 subespécies e 26 variedades. Distribuídos em todos os biomas, sendo a maior diversidade de espécies na Mata Atlântica (36,5%), Amazônia (30,5%) e Cerrado (29,4%), destacando-se como uma das dez famílias de angiospermas mais variadas do país (Koch *et al.*, 2016).

As espécies da família são conhecidas por apresentarem látex (Endress; Liede-Schumann; Meve, 2014; Fernandes *et al.* 2018) e exibem uma grande variedade de características, podendo assumir formas como arbustos, subarbustos eretos, trepadeiras, lianas, árvores, ervas ou plantas laticíferas (Souza & Lorenzi, 2019). A família é composta por um grupo de plantas de extrema relevância, sendo utilizadas pelas comunidades para diferentes finalidades, especialmente para fins ornamentais e medicinais, visto que essas plantas contêm compostos com atividade farmacológicas e biológica, incluindo alcaloides indólicos

Oliveira, M.G., Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da casca do caule de *Himatanthus drasticus* (mart.) plumel (Apocynaceae)

monoterpenóides, exemplificados pelos medicamentos quimioterápicos vincristina e vinblastina de *Catharanthus roseus* (L.) G.Don (Aslam *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2022).

A busca por compostos ativos vem se ampliando nos últimos tempos, principalmente no que diz respeito a confirmação de propriedades farmacológicas e químicas, mencionadas pelas comunidades tradicionais. Dentre as espécies de interesse, estão diversos representantes da família Apocynaceae (Santos *et al.*, 2013). Conforme mostrou um estudo de revisão feito por (Melo; Bonilla E Lucena, 2021) com as espécies *Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton (Algodão-de-seda), *Harconia speciosa* (Gomes) (Mangabeira), *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba), *Cryptostegia grandiflora* (R. Br.), *Cryptostegia madagascariensis* (Bojer) e *Allamanda blanchetti* (A. DC.) (Sete-patacas-roxa), onde todas apresentaram registros de princípios ativos, desde extratos das partes superiores (folhas, frutos e flores), raízes, cascas, até o látex.

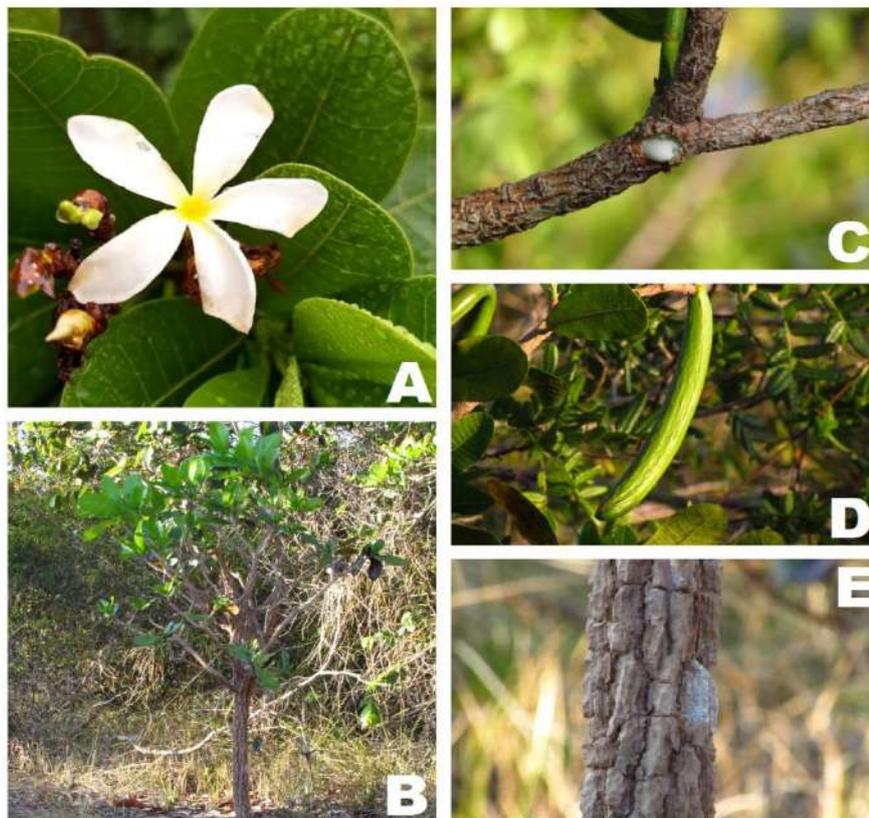
Quanto ao metabolismo, a análise fitoquímica dos integrantes da família Apocynaceae revelam uma grande variedade de compostos, incluindo alcaloides, terpenoides, esteroides, flavonoides, glicosídeos, fenóis simples, lactonas e hidrocarbonetos (Badhane, 2018). Esse grupo de plantas tem sido reconhecido por ser produtor único de metabólitos naturais com atividade biológica, incluindo substâncias como vincristina, vinblastina, reserpina e ioimbina (Mohammed *et al.*, 2021). Além de apresentarem efeitos positivos para a saúde humana devido as suas propriedades anti-inflamatórias, anticâncer, antioxidante, antiparasitária, antimicrobiana, larvicida e inseticida, conforme estudo de Melo; Bonilla; Lucena (2021).

## **2.6 *Himatanthus drasticus***

Dentre os membros da família Apocynaceae, *Himatanthus drasticus* (Figura 2) se destaca por ser objeto de estudos que evidenciam uma diversidade de atividades farmacológicas relevantes conforme demonstram estudos de Santos *et al.* (2022). A espécie é caracterizada por ser arbórea que podendo crescer até 7 metros de altura, apresentando folhagem densa nas extremidades (França *et al.*, 2011). Geograficamente, sua disposição é extensiva, pois está presente em boa parte do território brasileiro. Pode ser encontrada em até doze estados: Alagoas (AL), Bahia (BA), Ceará (CE), Maranhão (MA), Minas Gerais (MG), Pará (PA), Paraíba (PB), Pernambuco (PE), Piauí (PI), Rio Grande do Norte (RN), Roraima (RR) e Sergipe (SE), recebendo distintos sinônimos de acordo com a cultura local (Flora e Funga do Brasil, 2022; França *et al.*, 2011; Amaro *et al.*, 2006). No Ceará, a predominância de *H. drasticus*, popularmente chamada de “janaguba”, é notável na região da Chapada do Araripe, localizada

no extremo Sul do estado (Almeida *et al.*, 2019).

**Figura 2.** *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel; A: Flor; B: Hábito; C: Látex; D: Fruto; E: Caule



Fonte: Almeida-Bezerra, 2021

O caule dessa planta secreta látex ou seiva, que atua como um metabólito secundário afim de prover estratégias de defesa do vegetal contra patógenos, herbivoria, estresse e condições antrópicas (Colares *et al.*, 2013). Popularmente chamado de leite, esse composto auxilia como um complemento terapêutico frente algumas neoplasias, no tratamento de verminoses intestinais, hipertermia e úlceras que podem acometer o trato gastrointestinal, principalmente, na região do esôfago, estômago e intestino grosso (Vieira *et al.*, 2015; Mousinho *et al.*, 2011). Essas e outras indicações são justificadas uma vez que a espécie apresenta resultados de interesse para a pesquisa científica. Isso deve-se ao fato da *H. drasticus* apresentar efeitos moduladores de algumas atividades farmacológicas, como: anti-inflamatório, antinociceptivo (Almeida *et al.*, 2019; Matos *et al.*, 2013; Lucetti *et al.*, 2010), assim como já descrito o potencial gastroprotetor (Pinheiro *et al.*, 2013; Leite *et al.*, 2009; Colares *et al.*, 2013), antimicrobiano (Nascimento *et al.*, 2018; Figueiredo *et al.*, 2017), antitumoral (Santos *et al.*, 2018; Mousinho *et al.*, 2011), antidiabético (Morais *et al.*, 2020), cicatrizante (Santos *et al.*, 2017) e inseticida (Morais *et al.*, 2021). Dados como esses, contribuem para compreensão pelo

qual a janaguba tem sido bem relatada na literatura.

No que corresponde às estruturas e formas de utilização da espécie para fins medicinais, os galhos e folhas são relatados nos artigos como partes utilizadas na preparação de extratos (Figueiredo *et al.*, 2017; Sousa *et al.*, 2010). Contudo, houve maior prevalência pelo uso do látex obtido do tronco da planta, verifica-se ao fato da disponibilidade anual e maior representação dos princípios bioativos nesta parte e produto da planta (Almeida *et al.*, 2019; Colares *et al.*, 2013; França *et al.*, 2011; Leite *et al.*, 2009; Lucetti *et al.*, 2010; Matos *et al.*, 2013; Morais *et al.*, 2020; Moura *et al.*, 2020; Pinheiro *et al.*, 2013; Nascimento *et al.*, 2018). Do látex extraído ou adquirido comercialmente, é adicionado água de preferência filtrada para diluição com proporção de 1:1, dessa mistura, algumas gotas são incorporadas em 1 litro de água fria (Santos *et al.*, 2018; Mousinho *et al.*, 2011).

Autores concordam que o uso de fitoterápicos como meio de tratamento de enfermidades é uma estratégia interesse, uma vez que essa técnica terapêutica pode minimizar reações adversas de fármacos, podendo atuar de forma combinada com outros tratamentos (Figueiredo *et al.*, 2017; Lorenzi & Matos, 2021; Romm, 1999; Vieira, 1992). Ressalta-se que, para melhor segurança, é indicado que ao utilizar o leite da janaguba, assim como qualquer outra espécie, deve ser recomendada e assistida por um profissional de saúde, a fim de evitar superdosagens, explicar vias de administração, prováveis interações medicamentosas e frequência do uso, a atenção a esses fatores podem impossibilitar possíveis efeitos tóxicos ao organismo (Romm, 1999; Moura *et al.*, 2020; Sousa *et al.*, 2010).

Dentre os órgãos mais estudados de *H. dratiscus*, destacam-se as folhas, as quais apresentam diversos constituintes químicos presentes, tais como compostos fenólicos, dentre eles a quercetina, quercetina 3-latirósido, isoquercetrina, rutina, dentre outros (Tabela 1). Quanto ao produto, por ser o látex, o mais utilizado na medicina tradicional, era esperado que fosse o produto mais estudado do ponto de vista fitoquímico.

**Tabela 1.** Substâncias identificadas em *Himatanthus drasticus*

<b>Compostos</b>	<b>Produtos</b>	<b>Parte vegetal</b>	<b>Referência</b>
Cinamato de Lupeol	Extrato etanólico	Cascas do caule	Colares <i>et al.</i> , 2013
Plumericina	Extrato hidroalcoólico	Folhas	Figueiredo <i>et al.</i> , 2017

Quercetina	Extrato hidroalcoólico	Folhas	Figueiredo <i>et al.</i> , 2017
Quercetina 3-latirósido	Extrato hidroalcoólico	Folhas	Figueiredo <i>et al.</i> , 2017
Rutina	Extrato hidroalcoólico	Folhas	Figueiredo <i>et al.</i> , 2017
Isoquercetrina	Extrato hidroalcoólico	Folhas	Figueiredo <i>et al.</i> , 2017
Plumieride	Extrato hidroalcoólico	Folhas, látex	Figueiredo <i>et al.</i> , 2017; Morais <i>et al.</i> , 2020; Morais <i>et al.</i> , 2021
$\alpha$ -etil glicosídeo	Extrato hidroalcoólico	Látex	Morais <i>et al.</i> , 2020
Ácido protocatecuico	Extrato hidroalcoólico	Látex	Morais <i>et al.</i> , 2020
Ácido 3-O-cafeoilquínico	Extrato hidroalcoólico	Folhas e Látex	Figueiredo <i>et al.</i> , 2017; Morais <i>et al.</i> , 2020
Ácido 15-desmetil plumierido	Extrato hidroalcoólico	Látex	Morais <i>et al.</i> , 2020
Ácido 5-O-cafeoilquínico	Extrato hidroalcoólico	Látex	Morais <i>et al.</i> , 2020
Ácido cafeico	Extrato hidroalcoólico	Látex	Morais <i>et al.</i> , 2020
Ácido vanílico	Extrato hidroalcoólico	Látex	Morais <i>et al.</i> , 2020
Catequina	Extrato hidroalcoólico	Látex	Morais <i>et al.</i> , 2020
$\alpha$ -amirina	Extrato de acetato de etila, látex	Látex	Santos <i>et al.</i> , 2018; Moura <i>et al.</i> , 2020
$\beta$ -amirina	Extrato de acetato de etila	Látex	Santos <i>et al.</i> , 2018
Cinamato de Lupeol	Extrato de acetato de etila	Látex	Santos <i>et al.</i> , 2018
Oleanan-3(5),12-	Látex	Látex	Moura <i>et al.</i> , 2020

dieno			
Handianol	Látex	Látex	Moura <i>et al.</i> , 2020
24-Norursa-3,12-	Látex	Látex	Moura <i>et al.</i> , 2020
dieno			
Acetato de Lupeol	Látex	Látex	Moura <i>et al.</i> , 2020
Betulina	Látex	Látex	Moura <i>et al.</i> , 2020
Acetato de $\beta$ -Amirina	Látex	Látex	Moura <i>et al.</i> , 2020
3-epi-Betulina	Látex	Látex	Moura <i>et al.</i> , 2020
Acetato de $\alpha$ -amirina	Látex	Látex	Moura <i>et al.</i> , 2020
Fucosterol	Látex	Látex	Moura <i>et al.</i> , 2020
$\beta$ -amirina	Látex	Látex	Moura <i>et al.</i> , 2020
Acetato de betulinadeído	Látex	Látex	Moura <i>et al.</i> , 2020

---

Fonte: Autores.

Quanto ao potencial biotativo da espécie, foram avaliados produtos naturais obtidos a partir das folhas de *H. drasticus* apresentaram potencial antimicrobiano. O extrato hidroalcolico das folhas de *H. drasticus* (HDHE), por exemplo, demonstrou resultados promissores na diminuição da viabilidade e da formação de biofilme em *Klebsiella pneumoniae*. Além disso HDHE também foi capaz de aumentar a atividade da Ciprofloxacina, como verificado pelos efeitos aditivos e sinérgicos, talvez em virtude da presença de biocompostos (plumieride, plumericina, isoplumericina, quercetina e ácido clorogênico) já identificados como agentes antimicrobianos na literatura (Figueiredo *et al.*, 2017).

Além disso, no estudo de Nascimento *et al.* (2018), o látex *in natura* e o extrato acetato de etila do látex de *H. drasticus* apresentaram sinergismo na diminuição da CIM de aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina) frente às cepas bacterianas multirresistentes de *E. coli* (EC 27), *S. aureus* (SA 358) e *K. pneumoniae* (KP 10031).

No que diz respeito a toxicidade da espécie, nos estudos De Moura *et al.* (2020) não foi observado nenhum sinal de toxicidade ou mutagenicidade em camundongos tratados com 2000 mg/kg do látex de *H. drasticus*. Contudo, sinais de genotoxicidade foram observados no ensaio Cometa.

Entretanto, na pesquisa realizada por Mousinho *et al.*, 2011, as proteínas do látex de *H. drasticus* (HdPL) foram testadas quanto a capacidade de induzir a lise de eritrócitos. HdPL não

Oliveira, M.G., Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da casca do caule de *Himatanthus drasticus* (mart.) plumel (Apocynaceae)

apresentou efeito hemolítico, mesmo na maior dose testada (200 µg/ml). No mesmo estudo, as análises histopatológicas de modelo murino indicaram que o fígado e o rim foram fracamente afetados pelo tratamento com HdLP, entretanto ressalta-se que a toxicidade sistêmica induzida por HdLP precisar ser mais investigada a fim de estabelecer a segurança desse produto. Já, o extrato bruto metanólico das folhas de *H. drasticus* administrado oralmente na dose de 2000mg/kg apresentou baixa toxicidade aguda, porém carecem estudos em termos de toxicidade crônica, mutagenicidade e carcinogenicidade (Sousa *et al.*, 2010).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Material botânico

A coleta das cascas de *Himatanthus Drasticus* foi realizada às 8:00 horas em novembro 2021 na Floresta Nacional (FLONA) da Chapada do Araripe, no município de Barbalha sob as coordenadas W 39° 20' 43.1" and 7° 22' 48.5"S. Números de registro foram documentados no SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, ID:90149-1) e no Sistema de Gestão do Patrimônio Nacional Genética e Conhecimentos Tradicionais Associados (SisGen), sob código de registro A4848B1. Além disso, foram coletadas partes vegetativas e reprodutivas da espécie, que posteriormente foram prensados, desidratados e depositados no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri (URCA), sob o número de registro 15. 147.

#### 3.2 Preparação dos extratos

Para a produção dos extratos de *H. drasticus*, conforme a metodologia proposta por Rodrigues *et al.* (2022), inicialmente foram pesadas cerca de 206 g da casca do caule, passando posteriormente por desidratação a 45° C durante sete dias. Em seguida a casca do caule foi triturada com o auxílio de um liquidificador para aumentar a superfície de absorção e colocada em frasco de vidro com o solvente *n*-hexano, por 72h para extração do extrato. Passado esse período foi realizada uma filtração, onde a parte líquida passou pelo rotaevaporador para obtenção do extrato hexânico e a parte sólida passou por uma reextração com o solvente metanol e posteriormente também foi feita uma filtração e a parte líquida passou pelo rotaevaporador para obtenção do extrato metanólico. Finalizado o procedimento, o extrato hexânico de *H. drasticus* (EHHD) e o extrato metanólico de *H. drasticus* (EMHD), foram acondicionados em frascos de vidro e mantidos em temperatura ambiente.

#### 3.3 Prospecção fitoquímica

Os extratos passaram por uma triagem fitoquímica aplicada segundo a metodologia sugerida por Matos (1997) e Barbosa *et al.* (2004), com o intuito de verificar as principais classes de metabólitos secundários. Abrangendo a análise de compostos fenólicos, taninos hidrolisáveis, taninos, flavonoides, antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavonoides, leucoantocianidinas, catequinas, flavononas e alcaloides,

Oliveira, M.G., Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da casca do caule de *Himatanthus drasticus* (mart.) plumel (Apocynaceae)

conforme especificado na Tabela 2. Os resultados foram interpretados da seguinte maneira: (0) para negativo, (+) para positivo fraco, (++) para positivo moderado e (+++) para positivo forte, de acordo com a descrição anterior de Henrique *et al.* (2018) e Fontanills *et al.* (2018).

**Tabela 2.** Métodos de determinação fitoquímica qualitativa do Extrato Metanólico de *Himatanthus drasticus* (EMHD) e Extrato Hexânico *H. drasticus* (EHHD)

<b>Classes</b>	<b>Method</b>	<b>Reference</b>
<b>Fenólicos</b>	Reação FeCl <sub>3</sub>	Barbosa <i>et al.</i> , 2004; Hernández <i>et al.</i> , 2019
<b>Taninos hidrolisáveis</b>	Reação FeCl <sub>3</sub>	Barbosa <i>et al.</i> , 2004
<b>Taninos flababênicos</b>	Reação FeCl <sub>3</sub>	Barbosa <i>et al.</i> , 2004
<b>Antocianinas</b>	Reação ácida e alcalina	Barbosa <i>et al.</i> , 2004
<b>Antocianidinas</b>	Reação ácida e alcalina	Barbosa <i>et al.</i> , 2004
<b>Flavonas</b>	Reação alcalina	Barbosa <i>et al.</i> , 2004
<b>Flavonóis</b>	Reação alcalina	Barbosa <i>et al.</i> , 2004
<b>Xantonas</b>	Reação alcalina	Barbosa <i>et al.</i> , 2004
<b>Chalcones</b>	Reação ácida e alcalina	Barbosa <i>et al.</i> , 2004
<b>Auronas</b>	Reação ácida e alcalina	Barbosa <i>et al.</i> , 2004
<b>Flavonoides</b>	Reação alcalina	Barbosa <i>et al.</i> , 2004
<b>Leucoantocianidinas</b>	Reação ácida e alcalina	Barbosa <i>et al.</i> , 2004
<b>Catequinas</b>	Reação ácida e alcalina	Barbosa <i>et al.</i> , 2004
<b>Flavanonas</b>	Reação ácida e alcalina	Barbosa <i>et al.</i> , 2004
<b>Alcalóides</b>	Reação alcalina	Barbosa <i>et al.</i> , 2004

**Fonte:** De Menezes Filho e Santos, 2021.

### 3.4 Testes antibacterianos

#### 3.4.1 Antibióticos, meios de cultura e cepas bacterianas

Na realização dos experimentos foram utilizados os antibióticos: gentamicina, norfloxacina e oxacilina (Sigma Co., St. Louis, EUA). Os antibióticos foram solubilizados em água destilada esterilizada a uma concentração inicial de 1.024 µg/mL. Para a análise foram mensurados 10 mg dos extratos EMHD e EHHD, em seguida dissolvidos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada estéril, para chegar à concentração de 1.024 µg/mL. Os ensaios foram avaliados com o reagente de resazurina sódica (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), utilizado como indicador colorimétrico de crescimento bacteriano através de reações redox.

Como meio de cultura bacteriana, foi empregado o meio ágar infusão de coração (HIA, Difco laboratórios Ltda.), preparado de acordo com o fabricante; além do caldo de infusão de cérebro e coração (BHI Acumedia Manufacturers Inc.), que foi preparado na concentração de 10%. As bactérias padrões usadas foram: *Escherichia coli* ATCC 25.922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923; e as cepas multirresistentes: *E. coli* 06, *P. aeruginosa* 24 e *S. aureus* 10, concedidas pelo Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Para conduzir os ensaios, ambas foram armazenadas em refrigeração a 4 °C antes dos testes, e logo depois cultivadas em HIA, além de incubadas em estufa bacteriológica à uma temperatura de 37 °C por 24 h antes do início dos experimentos.

#### 3.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para determinação da CIM, foi aplicado o método de microdiluição em caldo (CLSI, 2015). Primeiramente, as cepas bacterianas foram suspensas em tubos de ensaio contendo 3 mL de solução salina estéril (0,9 %), usando uma alça de inoculação de níquel-cromo, até chegar a uma turbidez de 0,5 na escala de McFarland ( $10^5$  UFC/mL) para padronização dos inóculos.

Posteriormente, foram preparados eppendorfs com 1.350 µL de meio de cultura BHI líquido e 150 µL de inóculo bacteriano, resultando em um volume final de 1,5 mL. Essa solução foi utilizada para preencher com 100 µL as placas de fundo chato de 96 poços que foram usadas. Em seguida, foi realizada a microdiluição seriada (1:1 v/v) com os preparados de EMHD e EHHD obtendo diferentes concentrações (512 – 4 µg/mL), sendo o último poço de cada placa

utilizado como controle para o crescimento microbiano. Um controle adicional foi realizado para verificar a esterilidade do meio de cultura BHI líquido.

As placas foram acondicionadas em estufas bacteriológicas e incubadas por um período de 24 horas a 37 °C. Após esse tempo, em cada poço de crescimento bacteriano foi adicionada uma solução de 20 µL resazurina a 0,01 % para ocorrer reações oxirredutoras e as leituras foram efetuadas uma hora depois. Baseado na reação de oxidação-redução à temperatura ambiente, as mudanças de cor de azul para rosa foram observadas, indicando crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano. Os testes foram conduzidos em triplicata.

### **3.4.3 Avaliação da Atividade Intensificadora de Fármacos**

Para avaliar o efeito dos extratos em combinação com antibióticos contra bactérias multirresistentes, os produtos foram analisados em concentração subinibitória (CIM/8) e em triplicata, conforme o método proposto por Coutinho *et al.* (2008).

Para tanto *Eppendorfs* foram preparados contendo o EMHD e o EHHD em concentrações 16 µg/mL, 32 µg/mL e 128 µg/mL, suspensões de 10<sup>5</sup> UFC/mL dos microrganismos foram adicionadas juntamente com meio de cultura BHI líquido. Os antibióticos (gentamicina, norfloxacin e oxacilina) foram controlados com a mesma quantidade de inóculo bacteriano correspondente a 10 % do volume do eppendorf e 1.350 µL de meio BHI. Placas de microdiluição de 96 poços foram preenchidas com 100 µL das soluções preparadas. Adicionalmente, 100 µL de cada antibiótico na concentração de 1.024 µg/mL foram adicionados, e microdiluições seriadas foram realizadas na proporção de 1:1, variando de 512 µg/mL no primeiro poço a 0,5 µg/mL no penúltimo poço. O último poço de cada placa foi reservado para o controle positivo do teste.

### **3.5 Teste de mortalidade com *Drosophila melanogaster* e teste de desempenho locomotor**

Para realização dos testes os espécimes de *Drosophila melanogaster* Oregon-R foram adquiridos do Laboratório de Biologia e Toxicologia (BIOTOX) da Universidade Regional do Cariri (URCA) e criados sendo alimentação composta por 1% p/v de levedura de cerveja, 2% p/v de sacarose, 1% p/v de leite em pó e 0,08% p/v de metilparabeno. Os insetos foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada (25 °C), umidade relativa (60-70 %) e ciclo de claro/escuro de 12 horas (Costa *et al.*, 2020).

Com o objetivo de avaliar a toxicidade por ingestão, foram preparadas concentrações do EMHD e do EHHD (100, 500 e 1.000 mg/g), além do controle negativo (1.500 µL de água), e inseridas à dieta basal das moscas. A seguir, foram utilizados 24 recipientes de vidro de 330 ml, onde foram distribuídos 15 g de alimento e 10 moscas em cada frasco. O experimento foi realizado em triplicata, e a quantidade de moscas mortas foi calculada a cada 24 horas durante um período experimental de cinco dias de exposição, sendo a taxa de mortalidade estipulada pela contagem do número de moscas mortas.

Após a contagem do último dia do experimento, as moscas sobreviventes foram usadas para realizar o teste da geotaxia negativa. Para isso as moscas foram colocadas em diapositiva em gelo por um minuto e acomodadas em colunas de vidro verticais de acordo com cada concentração e extrato. Logo após a recuperação das moscas, foram aplicadas suaves batidas na base do tubo de vidro e o número de indivíduos que atingiu cinco centímetros da coluna (topo) durante o período de seis segundos foram contabilizadas (Costa *et al.*, 2020).

### **3.6 Teste de letalidade com *Artemia salina***

O teste de toxicidade com *A. salina* foi conduzido seguindo o método descrito por Meyer *et al.* (1982). Foram adicionados cistos de *A. salina* em água salina preparada artificialmente, que foram submetidos a aeração constante por 24 horas, intervalo de tempo necessário para a incubação das larvas. Logo após, os extratos foram diluídos em diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL) e adicionados em tubos de ensaio, onde foram adicionadas cinco larvas de microcrustáceos em cada concentração, além do controle. A leitura foi feita em um estereomicroscópio após um período de 24 horas.

### **3.7 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas usando o teste ANOVA one-way, seguido pelo teste post hoc de Bonferroni, Tukey a 5% de confiabilidade e Dunnett para testes de toxicidade. Os resultados foram classificados como significativos quando  $p < 0,05$  e não significativos quando  $p > 0,05$ . Quanto as médias  $\pm$  desvio padrão foram expressas, e o software GraphPad Prisma, versão 6.0, foi utilizado para as análises estatísticas. Além disso, as CL<sub>50</sub> (50% de concentração letal) foram determinadas por meio de análise de regressão não linear com interpolação da curva padrão desconhecida.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Prospecção fitoquímica

Conforme os dados expostos na Tabela 3, verificou-se a detecção (+) positiva fraca de flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, aurona, catequinas e flavononas para ambos os extratos. Houve também identificação (+) positivo fraca para taninos condensados no extrato metanólico de *Himatanthus drasticus* (EMHD). Enquanto que para o extrato hexânico de *H. drasticus*, observou-se uma identificação (+) positiva fraca para fenóis, porém a presença de taninos condensados foi ausente. Esses resultados indicam diferenças notáveis entre os perfis químicos dos dois extratos, destacando-se as variações na presença ou ausência de componentes específicos.

**Tabela 3.** Prospecção fitoquímica do Extrato Metanólico de *Himatanthus drasticus* (EMHD) e Extrato Hexânico *H. drasticus* (EHHD). Ausência da classe (-); presença da classe (+)

Classes	EMHD	EHHD
<b>Fenóis</b>	-	+
<b>Taninos hidrolisáveis</b>	-	-
<b>Taninos condensados</b>	+	-
<b>Antocianinas</b>	-	-
<b>Antocianidinas</b>	-	-
<b>Flavonas</b>	+	+
<b>Flavonóis</b>	+	+
<b>Xantonas</b>	+	+
<b>Chalconas</b>	+	+
<b>Auronas</b>	+	+
<b>Flavanonóis</b>	-	-
<b>Leucoantocianidinas</b>	-	-
<b>Catequinas</b>	+	+
<b>Flavononas</b>	+	+
<b>Alcalóides</b>	-	-

Legenda: Ausência da classe (-); presença da classe (+). **Fonte:** Autora, 2024.

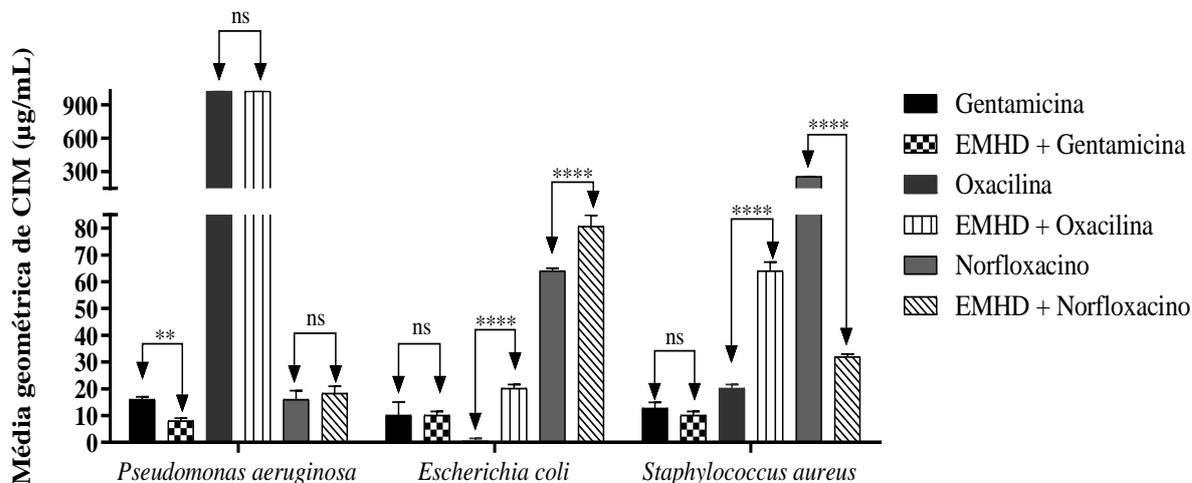
## 4.2 Atividade antibacteriana e efeito intensificador da ação fármaco

Os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) indicaram a ausência de atividade antibacteriana direta dos extratos metanólico e hexânico de *H. drasticus* em relação às cepas analisadas. Verificou-se que os valores de CIM foram consistentemente elevados, permanecendo superiores a 512 µg/mL, tanto para as cepas bacterianas padrões quanto para aquelas resistentes a múltiplos fármacos.

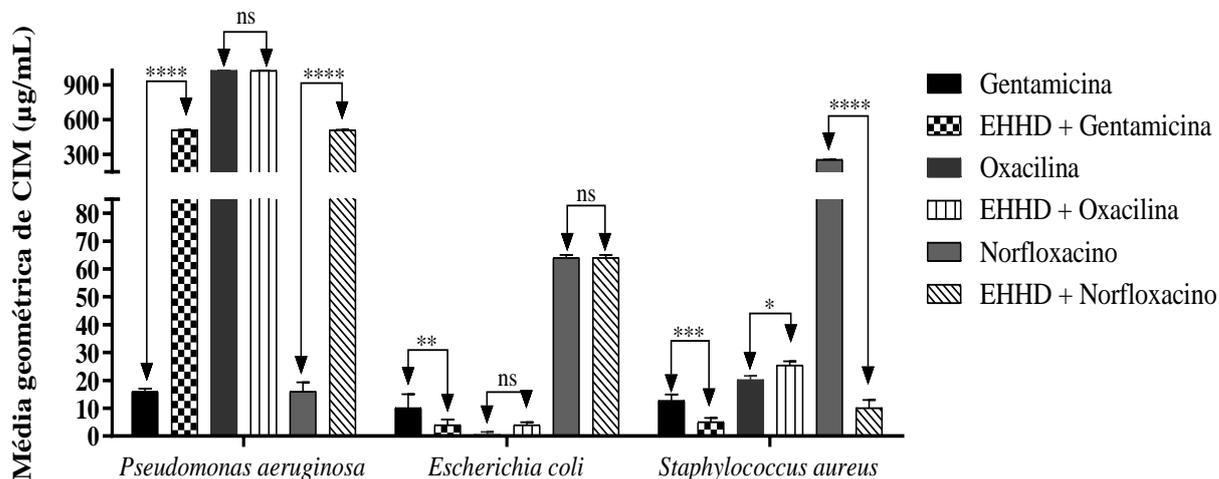
Conforme ilustrado nas Figuras 3 e 4, a coadministração do EMHD (Figura 3) e do EHHD (Figura 04) de *Himatanthus drasticus*, em conjunto com antibióticos clinicamente utilizados, revelou uma notável e significativa atividade potencializadora ( $p < 0,0001$ ) quando combinada com alguns dos fármacos de referência.

A Figura 3 evidencia que o EMHD teve um efeito potencializador significativo para o fármaco norfloxacino ( $p < 0,0001$ ) em relação à cepa *Staphylococcus aureus*, e para a gentamicina em relação a *Pseudomonas aeruginosa* ( $p < 0,01$ ). Esta potencialização resultou em uma diminuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do antibiótico. No entanto, foi observado um efeito contrário, diminuindo a ação do fármaco oxacilina em relação a *Escherichia coli* e *S. aureus* ( $p < 0,0001$ ).

Resultados semelhantes foram observados com a administração do fármaco norfloxacino combinado com o EHHD (Figura 4) contra *S. aureus*, evidenciando uma marcante redução da CIM do antibiótico (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). Além disso, demonstrou-se uma potencialização significativa ( $p < 0,01$ ) na gentamicina combinada com o EHHD para *E. coli* e *S. aureus*. Já na coadministração de gentamicina e norfloxacina em relação à bactéria *P. aeruginosa*, foi observada uma notável redução na ação dos fármacos (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ), resultando em um aumento na média geométrica da CIM para esses fármacos.



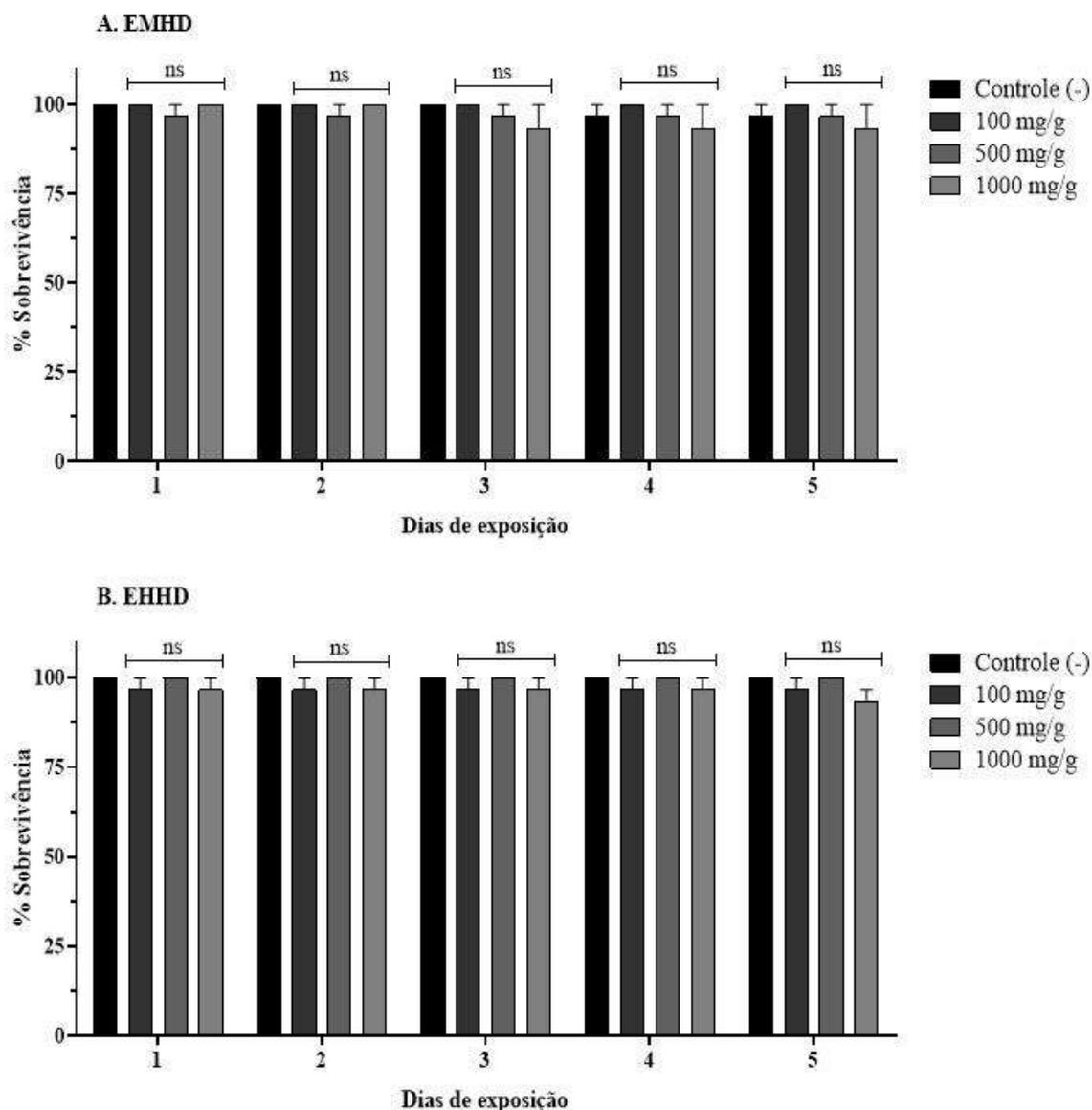
**Figura 3.** Efeito de modulação do Extrato Metanólico de *Himatanthus drasticus* (EMHD) em associação com gentamicina, oxacilina e norfloxacino contra *Pseudomonas aeruginosa* 24, *Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli* 06. Controle refere-se a antibiótico-isolado. \*\*\*\* valor estatisticamente significativo quando  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , não estatisticamente significativo (ns) quando  $p > 0,05$ .



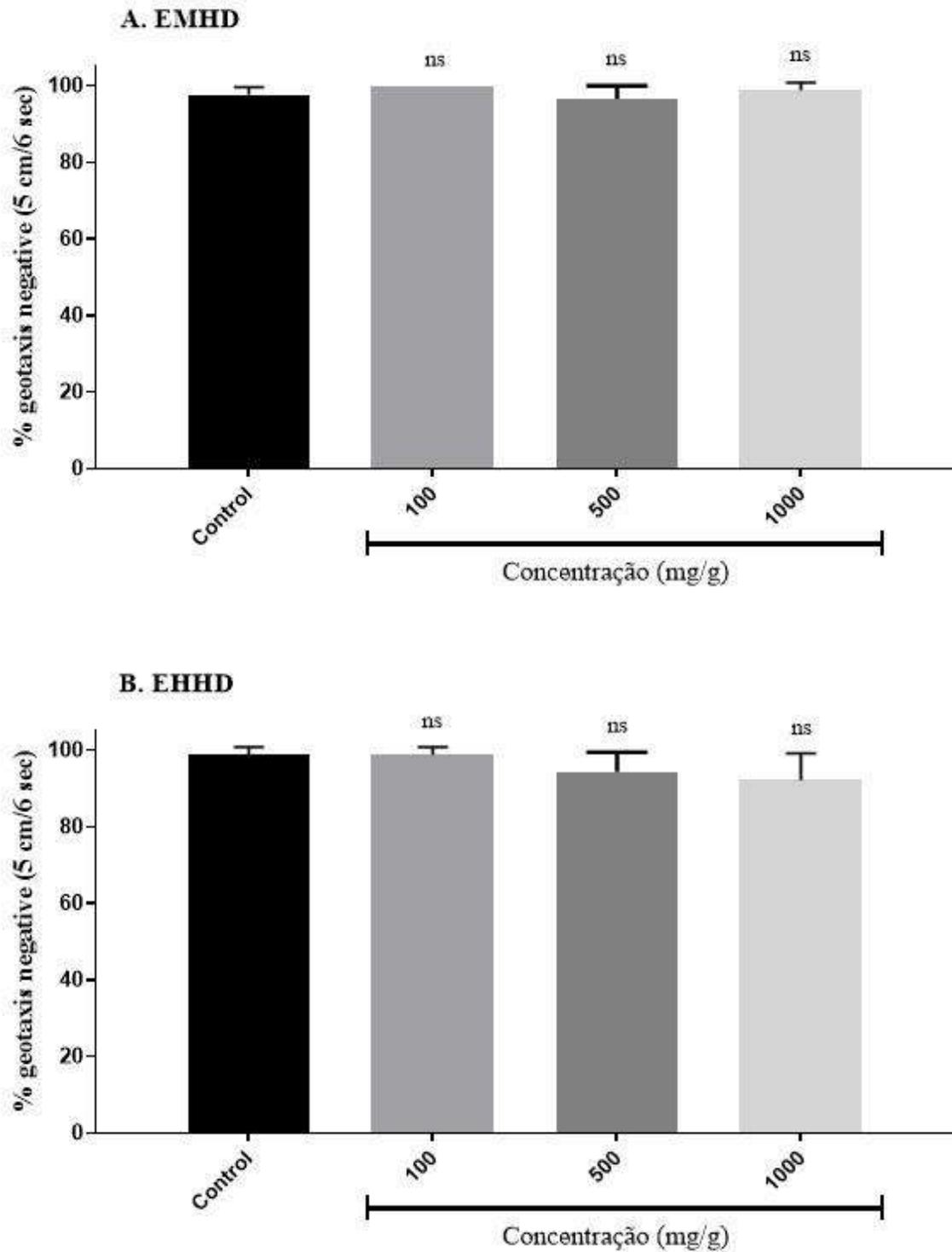
**Figura 4.** Efeito de modulação do Extrato Hexânico de *Himatanthus drasticus* (EHHD) em associação com gentamicina, oxacilina e norfloxacino contra *Pseudomonas aeruginosa* 24, *Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli* 06. Controle refere-se a antibiótico-isolado. \*\*\*\* valor estatisticamente significativo quando  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , não estatisticamente significativo (ns) quando  $p > 0,05$ .

### 4.3 Atividade tóxica e geotaxia negativa utilizando *Drosophila melanogaster*

De acordo com a representação na Figura 5, o EMHD e o EHHD não demonstraram efeitos toxicológicos significativos em nenhuma das concentrações testadas durante o ensaio realizado durante cinco dias utilizando o organismo modelo *D. melanogaster*, quando comparado ao controle negativo. Paralelamente a essas observações, não foram registrados efeitos adversos na geotaxia negativa em nenhuma das concentrações testadas para ambos os extratos, conforme ilustrado na Figura 6.



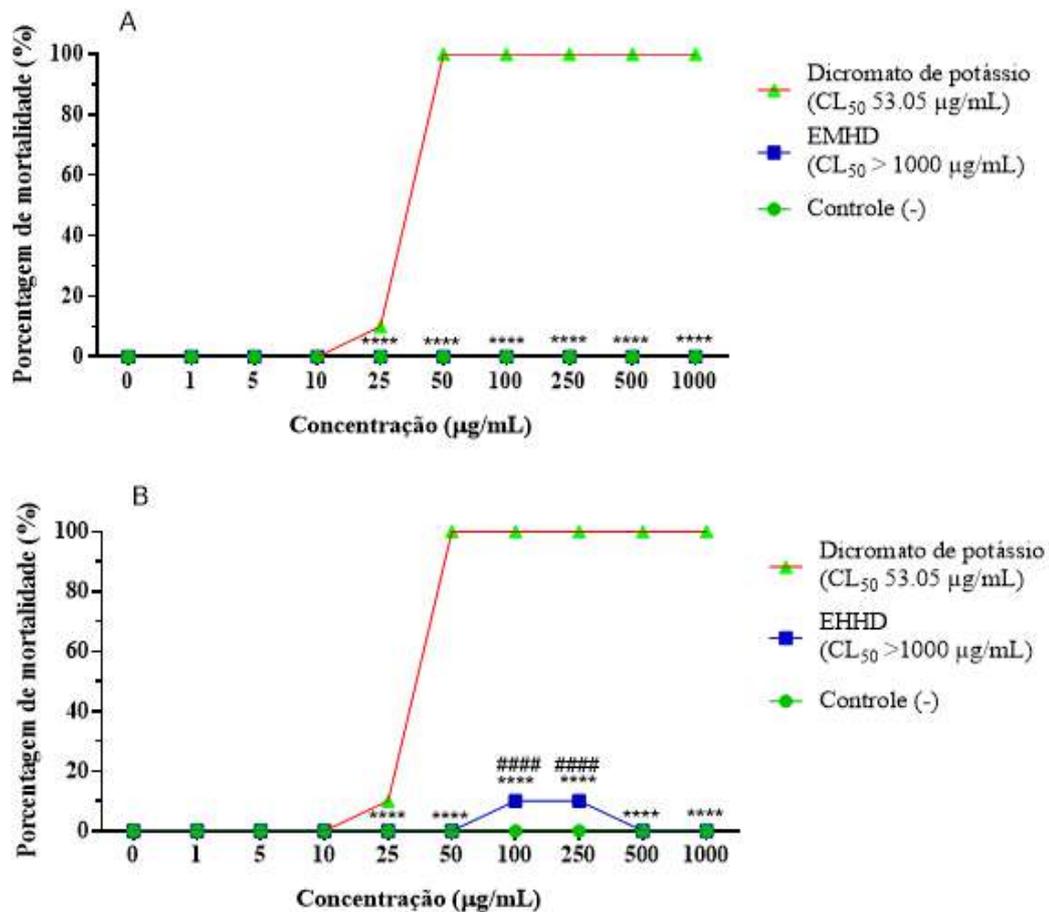
**Figura 5.** Porcentagem de sobrevivência de *Drosophila melanogaster* expostas a diferentes concentrações de extratos durante 5 dias de exposição. A: Extrato Metanólico de *Himatanthus drasticus* (EMHD). B: Extrato Hexânico de *Himatanthus drasticus* (EHHD). Não estatisticamente significativo (ns) quando  $p > 0,05$ .



**Figura 6.** Porcentagem de danos ao aparelho locomotor (geotaxia negativa) de *Drosophila melanogaster* expostas a diferentes concentrações de Extrato. A: Extrato Metanólico de *Himatanthus drasticus* (EMHD). B: Extrato Hexânico de *Himatanthus drasticus* (EHHD). Não estatisticamente significativo (ns) quando  $p > 0,05$ .

#### 4.4 Atividade toxicológica usando *Artemia salina*

Com base na Figura 7, no que diz respeito aos resultados *A. salina*, pode-se afirmar que não foram observados efeitos tóxicos significativos com o modelo testado quando utilizando o extrato metanólico. No entanto, em relação ao extrato hexânico (figura 7), foi evidenciada uma leve toxicidade nas concentrações de 100 e 250  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,0001$ ). Em ambos os casos, a determinação da  $CL_{50}$  (concentração letal para 50% dos organismos) revelou valores superiores a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Conforme definido por Meyer et al. (1982), uma  $CL_{50}$  inferior a 1000  $\mu\text{g/mL}$  é considerada bioativa. Portanto, com base nesses critérios, embora tenha sido observada uma leve toxicidade em algumas concentrações do extrato hexânico, a  $CL_{50}$  global permanece acima de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , indicando uma baixa toxicidade.



**Figura 7.** Porcentagem de Mortalidade de *Artemia salina*. A: Extrato Metanólico de *Himatanthus drasticus* (EMHD). B: Extrato Hexânico de *H. drasticus* (EMHD). Os valores foram calculados como porcentagens relativas no controle vivo, N=3. \*\*\*\* valor estatisticamente significativo  $p < 0,0001$ , quando comparada ao controle dicromato de potássio; ##### valor estatisticamente significativo  $p < 0,0001$ , quando comparada ao controle negativo; não estatisticamente significativo (ns) quando  $p > 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

A presença de flavonas, flavonóis, chalconas, auronas e flavononas em extratos vegetais desperta interesse pela diversidade de suas propriedades. Dentre os compostos fitoquímicos identificados em ambos os extratos testados, estes se destacam. Esses flavonoides são reconhecidos por suas atividades biológicas (Ullah *et al.*, 2020). Em seus estudos Santos *et al.* (2018) e Leandro *et al.* (2023) revelaram descobertas notáveis sobre os flavonoides presentes no látex de *Himatanthus drasticus*. Enquanto Santos *et al.* (2018) identificaram esses compostos durante a triagem fitoquímica do extrato de acetato de etila, Leandro *et al.* (2023) encontraram flavonoides, taninos condensados e catequinas ao investigar extratos metanólico, acetato de etila e hexano do látex da mesma planta. Adicionalmente, Pereira *et al.* (2022) associaram a presença de flavonoides nessa espécie ao seu potencial antimicrobiano. Esses achados reforçam a importância desses compostos na manifestação de propriedades bioativas diversas, sugerindo que esta espécie botânica pode ser uma fonte promissora para aplicações terapêuticas e antimicrobianas. Dados que corroboram com os nossos achados na triagem fitoquímica.

Neste estudo, não se evidenciou atividade antibacteriana direta dos extratos metanólico e hexânico em relação às cepas avaliadas, apesar de ambos os extratos apresentarem uma presença significativa de metabólitos secundários, com isso é plausível sugerir que a presença desses metabólitos em quantidades reduzidas não tenha sido suficiente para inibir os patógenos testados. Essa constatação corrobora com resultados encontrados por Rocha *et al.* (2020), os quais testaram a atividade antibacteriana do látex comercial de *H. drasticus* contra *S. aureus* (ATCC 14458), *E. coli* (ATCC 111775), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 14028), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) mas não identificaram propriedade antibacteriana significativa.

Apesar da ausência de atividade direta contra as cepas testadas, ambos os extratos revelaram um efeito potencializador da ação do fármaco norfloxacino, particularmente em relação a *S. aureus*. Nesse contexto, quando utilizados em concentrações subinibitórias, os flavonoides facilitam a entrada do antibiótico no citoplasma bacteriano, aumentando a permeabilidade celular. Este mecanismo favorece a eficácia de fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol, que atuam no interior da célula bacteriana (Kowalski *et al.*, 2020). Como é o caso da norfloxacina que atua inibindo a ação das subunidades “A” da DNA-girase ou topoisomerase II, promovendo danos estruturais no DNA bacteriano e resultando na morte bacteriana (Chierentin & Salgado, 2016). Como resultado,

observa-se uma redução na Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fármaco, possibilitando a diminuição das doses do antibiótico, conforme descrito por Figueiredo *et al.* (2017). O que pode explicar a ação intensificadora de fármacos observada, visto que os flavonoides se destacam como compostos majoritários encontrados no EHHD e no EMHD de *H. drasticus* deste estudo.

O efeito aditivo do extrato hexânico (EHHD) quando combinado com a gentamicina frente a *S. aureus* e *E. coli*. Esses resultados são congruentes com o estudo conduzido por Nascimento *et al.* (2018), no qual a avaliação fitoquímica e antibacteriana do extrato acetato de etila do látex de *H. drasticus* (EAEHD) não revelou atividade antibacteriana direta contra as cepas padrões. Entretanto, a combinação do EAEHD com gentamicina demonstrou efeito potencializador contra as cepas multirresistentes SA 358 e EC 27, sendo associado pelos autores à presença de flavonoides, taninos e catequinas, que são capazes de modificar a parede celular ou romper membrana plasmática facilitando a entrada de drogas. Como a gentamicina que atua no interior da célula, inibindo a síntese proteica, ligando-se a subunidade 30S do ribossomo (Gazineo *et al.*, 2023). Importante notar que essa combinação apresentou antagonismo contra *P. aeruginosa*. Essas observações destacam a complexidade das interações entre os extratos de *H. drasticus* e agentes antimicrobianos e reforça a capacidade dessa espécie vegetal de modular a eficácia de fármacos antimicrobianos.

Levando em consideração que a penicilinas atuam inibindo a transpeptidação que ocorre na síntese da parede, se ligando por covalência a proteína de ligação à penicilina (PBP), causando a interrupção da síntese de peptidoglicano e consequentemente a morte celular (Corrêa *et al.*, 2020). A ação redutora na eficácia da oxacilina pode ser atribuída à capacidade dos extratos EMHD e EHHD de diminuir a capacidade do fármaco de inibir a síntese da parede bacteriana, conforme observado em estudos prévios sobre a atuação desses extratos em combinação com antibióticos. A redução na eficácia de antibióticos quando associados com extratos de plantas medicinais podem decorrer ainda da interação entre agentes bactericidas e bacteriostáticos, ambos atuando sobre o mesmo alvo do microrganismo. Assim como das interações químicas entre esses compostos, tanto de forma direta quanto indireta (Santos *et al.*, 2021). Portanto é plausível sugerir que a combinação dos extratos de *H. drasticus* em estudo com a oxacilina e a gentamicina esteja reduzindo a eficácia dos antibióticos contra as diferentes cepas testadas, devido à complexidade das interações químicas que ocorrem entre os compostos envolvidos. Destacando assim a importância de considerações cuidadosas ao explorar a combinação de fitoquímicos com antibióticos

Conforme abordado por Bhadane *et al.* (2018) em sua revisão, a família Apocynaceae é reconhecida na medicina popular devido às suas propriedades terapêuticas, entretanto, muitos de seus representantes também exibem toxicidade, sendo alguns utilizados inclusive como agentes venenosos. Essa característica de toxicidade na família frequentemente está associada à presença de alcaloides, fato que poderia explicar a ausência de efeitos tóxicos observados nos extratos de *H. drasticus* no presente estudo.

Utilizando o organismo *D. melanogaster* para avaliação da toxicidade, modelo também utilizado neste estudo, Silva *et al.* (2022), também destacaram uma baixa toxicidade para todas as concentrações entre 0,05 - 0,1 mg/mL do extrato das cascas de *Himatanthus sucuuba*, espécie do mesmo gênero de *H. drasticus*. Os achados deste estudo corroboram ainda com Sousa *et al.* (2010), que relataram uma toxicidade reduzida em doses de 50, 300 e 2.000 mg/kg do extrato metanólico bruto das folhas de *H. drasticus*, em um teste de toxicidade aguda por via oral em camundongos. Contrariamente, em um estudo sobre a toxicidade e/ou mutagenicidade da espécie *H. drasticus* em camundongos, conduzido por De Moura *et al.* (2020), não foram observados vestígios clínicos de ação tóxica, mesmo com doses atingindo o limite de 2.000 mg/kg. Essa convergência de resultados destaca a aparente segurança dos extratos de *H. drasticus* em diferentes concentrações, reforçando a perspectiva de sua aplicabilidade potencial em contextos terapêuticos.

Neste estudo, a avaliação da taxa de mortalidade em *Drosophila melanogaster* não revelou resultados significativos, indicando ausência de toxicidade para o modelo testado. A análise da atividade locomotora dessas moscas, avaliada por meio da geotaxia negativa, não demonstrou efeitos adversos em nenhuma das concentrações testadas para ambos os extratos, sugerindo que o aparelho locomotor das moscas não foi comprometido. O teste de escalada, amplamente utilizado em *D. melanogaster*, serve como um indicador sensível de alterações na capacidade de escalada das moscas, podendo ser atribuído a diversas causas, como comprometimento neuromotor ou estresse (Zhong *et al.*, 2022).

No que concerne à atividade toxicológica utilizando *Artemia salina*, embora o Extrato Hexânico (EHHD) da *H. Drasticus* (EMHD), tenha apresentado uma leve toxicidade nas concentrações de 100 e 250 µg/mL, a Concentração Letal para 50% (CL<sub>50</sub>) permanece acima de 1000 µg/mL, indicando que o uso dos extratos não implica riscos significativos à saúde. Conforme verificado em um estudo envolvendo uma espécie da mesma família de *H. drasticus*, a *H. sucuuba*, que apresentou resultados satisfatórios e sugeriu um perfil de segurança adequado, uma vez que não foram observadas alterações entre as *Artemia salina* expostas ao

Oliveira, M.G., Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da casca do caule de *Himatanthus drasticus* (mart.) plumel (Apocynaceae)

extrato etanólico nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL e as *artemias* do grupo controle (Lopes *et al.*, 2021).

## 6. CONCLUSÃO

Os extratos metanólico e hexânico da casca do caule de *H. drasticus* exibiram semelhanças marcantes em sua composição fitoquímica, com os flavonoides destacando-se como os constituintes mais abundantes em ambos. Não foi observada toxicidade, conforme avaliado nos modelos in vivo *D. melanogaster* e *A. salina*, tornando seguro o seu uso. Nenhum dos extratos apresentou atividade antibacteriana, mas ambos foram capazes de intensificar os antibióticos norfloxacino e gentamicina contra cepas padrões e multirresistentes, quando usados em combinação. Foi verificado também a redução da ação da oxacilina quando combinada com os extratos, contra as algumas das cepas testadas. Assim, esses resultados são promissores, todavia são necessários mais estudo para elucidar tanto os mecanismos de ação como a relação entre os compostos dos extratos metanólico e hexânico de *H. drasticus* e as drogas antimicrobianas.

Oliveira, M.G., Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da casca do caule de *Himatanthus drasticus* (mart.) plumel (Apocynaceae)

## REFERÊNCIAS

Abd El-Baky, R. M. *et al.* Prevalence and some possible mechanisms of colistin resistance among multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Drug Resistance**. v. 13, p. 323-332, 2020.

Abd Ellah, N. H. *et al.* Efficacy of ketoconazole gel-flakes in treatment of vaginal candidiasis: formulation, *in vitro* and clinical evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 567, p. 118472, 2019.

Abrantes, J. A.; Nogueira, J. M. R. Resistência bacteriana aos antimicrobianos: uma revisão das principais espécies envolvidas em processos infecciosos / Bacterial resistance to antimicrobials: a review of the main species involved in infectious processes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 53, n.3, p. 219-223, 2021.

Almeida, S. C. X. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a triterpene-rich fraction from *Himatanthus drasticus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 52, n. 5, p. 1-13, 2019.

Amaro, M. S. *et al.* Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de janaguba (*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel.-Apocynaceae). **Revista Brasileira de Sementes**. v. 28, p. 63-71, 2006.

Anand, U. *et al.* A review on antimicrobial botanicals, phytochemicals and natural resistance modifying agents from Apocynaceae family: Possible therapeutic approaches against multidrug resistance in pathogenic microorganisms. **Drug Resistance Updates**. v. 51, p. 100695, 2020.

Aslam, S. K. Z. *et al.* *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. An important drug: its applications and production. **Pharmacie Globale: International Journal of Comprehensive Pharmacy**. v.4, p. 1-16, 2010.

Ayukekbong, J. A; Ntemgwa, M. & Atabe, N. A. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. **Antimicrob Resist Infect Control**. v. 6, n. 47, p. 1-8, 2017.

Barbosa, W. L. R. *et al.* Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Revista Científica da UFPA**. v. 4, 2004.

Başaran, N.; Pasli, D.; Başaran, A. A. Unpredictable adverse effects of herbal products. **Food and Chemical Toxicology**. v. 159, p. 112762, 2022.

Bello, A.; Dingle, T. C. What's That Resistance Mechanism? Understanding Genetic Determinants of Gram-Negative Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Newsletter**. v. 40, n. 20, p. 165–174, 2018.

Oliveira, M.G., Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da casca do caule de *Himatanthus drasticus* (mart.) plumel (Apocynaceae)

Bernardes, L. M. M. *et al.* *Drosophila melanogaster* como modelo para estudos relacionados à toxicidade dos óleos essenciais de lavanda, gengibre e copaíba. **Plos one**. v. 18, n. 9, p. e0291242, 2023.

Bezerra, J. W. A. *et al.* Chemical composition, antimicrobial, modulator and antioxidant activity of essential oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v. 65, p. 58-64, 2019.

Bhadane, B. S. *et al.* Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: A review. **Phytotherapy research**. v. 32, n. 7, p. 1181–1210, 2018.

Bitu, V. C. N. *et al.* Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 172, p. 265–272, 2015.

Borges, R.; Peixoto, A. L. Conhecimento e uso de plantas em uma comunidade caiçara do litoral sul do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 23, p. 769-779, 2009.

BRASIL. (1998). Decreto nº 2.519, de 16 de março de 1998. Promulga a Convenção sobre Diversidade Biológica, assinada no Rio de Janeiro, em 05 de junho de 1992. Disponível em [www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/d2519.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/d2519.htm)

Brito, M. F. M. D.; Marín, E. A.; Cruz, D. D. D. Medicinal plants in rural settlements of a protected area in the littoral of northeast Brazil. **Ambiente & Sociedade**. v. 20, n. 1, p. 83–104, jan. 2017.

Buffé, C.; Araújo, B. V.; Costa, T. D. Parâmetros Farmacocinéticos e Farmacodinâmicos na otimização de terapias antimicrobianas. **Caderno de Farmácia**. v. 17, n. 2, p. 97–109, 2001.

Chierentin, L. & Salgado, H. R. Review of Properties and Analytical Methods for the Determination of Norfloxacin. **Critical reviews in analytical chemistry**. v. 46, n.1, p. 22-39, 2016.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. I document. M100-S16 CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA:NIH (2015), p. 184.

Colares, A. V. *et al.* Efeito gastroprotetor do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). **Infarma-Ciências Farmacêuticas**. v. 20 n.11/12, p. 34-36, 2013.

Corrêa, L. T. *et al.* Características gerais dos principais antimicrobianos: Uma revisão de literatura. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**. v. 13, n. 2, p. 38-47, 2020.

Oliveira, M.G., Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da casca do caule de *Himatanthus drasticus* (mart.) plumel (Apocynaceae)

Costa, A. R. *et al.* Phytochemical profile of *Anacardium occidentale* L. (cashew tree) and the cytotoxic and toxicological evaluation of its bark and leaf extracts. **S. Afr. J. Bot.** v.135, p. 355–364, 2020.

Costa, A., & Silva Junior, A. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**. v. 7, n. 2, 2017.

Coutinho, D.F.; Travassos, L.M.A.; Amaral, F.M.M. 2002. Estudo etno dirigido de plantas medicinais no Estado do Maranhão-Brasil. **Visão Acadêmica**. v. 3, p. 7-12, 2002.

Coutinho, H. D. M. *et al.* Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**. v. 54, n.4, p. 328–330, 2008.

Crepaldi, C. G. *et al.* Richness and ethnobotany of the family Euphorbiaceae in a tropical semiarid landscape of Northeastern Brazil. **Soul African Journal of Botany**. v. 102, p 157-165, 2016.

Cruz, R. P., *et al.* Ethnopharmacology of the angiosperms of Chapada of Araripe located in Northeast of Brazil. **Journal of Environmental Analysis and Progress**. v.6, n. 4, p. 326-351, 2021.

Dalmolin, J. *et al.* Mechanisms of expression of resistance to antibiotics and public health. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**. v. 26, n, 3, p. 681-692, 2022.

De Menezes Filho, A. C. P.; Santos, M. C. Prospecção fitoquímica, físico-química e biológica do extrato hidroetanólico floral de [*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.]. **Biológicas & Saúde**. v. 11, n. 36, p. 1-25, 2021.

De Moura, D. F. *et al.* Evaluation of the cytotoxicity, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of the latex extracted from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 253, p.112567, 2020.

De Souza, Z. N. *et al.* Plantas medicinais utilizadas no nordeste do brasil: uma revisão de literatura. **Ciências da Saúde e Suas Contribuições Sociais** - Editora IIDV, 2019.

Denamur, E. *et al.* The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. v. 19, n. 1, p. 37-54, 2021.

Efferth, T. *et al.* Medicinal plants and phytochemicals against multidrug-resistant tumor cells expressing ABCB1, ABCG2, or ABCB5: a synopsis of 2 decades. **Phytochemistry Reviews**. v. 20, n. 1, p. 7-53, 2021.

Endress, M. E.; Liede-Schumann, S.; Meve, U. Na updated classification for Apocynaceae. **Phytotaxa**. v. 159, 2014.

Oliveira, M.G., Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da casca do caule de *Himatanthus drasticus* (mart.) plumel (Apocynaceae)

Endress, M. E. *et al.* Apocináceas. In: Kadereit, J., Bittrich, V. (eds) Plantas com flores. Eudicotiledôneas. As Famílias e Gêneros de Plantas Vasculares. **Springer, Cham**. v, 15, 2018.

Estrela, T.S. Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. **Brasil, Ministério da Saúde**. Assessoria de assuntos internacionais de saúde. Saúde e política externa. v. 20, p. 1998-2018, 2018.

FAPESP, 2022. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. BIOTA-FAPESP. <https://fapesp.br/biota/> (acessado em 15 de setembro 2023).

Fernandes, G.E.A.; Mota, N.F.de.O.; Simões, A.O. Flora das Cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Apocynaceae. **Rodriguésia**. v. 69, n. 1, 2018.

Fernandes, P. A. S. *et al.* Diversidade de uso medicinal da flora em uma área de cerrado na Chapada do Araripe, NE, BR. In: Silva, C. D. D. **Ciências biológicas: realidades e virtualidades**. Ponta Grossa - PR: Atena, 2020.

Figueiredo, C. S. S. E. S. *et al.* *Himatanthus drasticus* leaves: chemical characterization and evaluation of their antimicrobial, antibiofilm, antiproliferative activities. **Molecules**. v. 22, n. 6, p. 910, 2017.

Flora e Funga do Brasil. Base de dados - Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ), 2022. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB4621>. Último acesso em: 22 ago. 2022.

Fontanills, Y. R.V. *et al.* Propriedades fitoquímicas y antibacterianas de los extractos de las hojas de *Agave fourcroydes* Lem. (henequén). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 23, 2018.

França, W. C. D. S. C. *et al.* Analysis of the action of *Himatanthus drasticus* in progression of urethane-induced lung cancer in mice. **Einstein**. v. 9, p. 350-353, 2011.

Freitas, M. A. *et al.* HPLC–DAD analysis and antimicrobial activities of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). **3 Biotech**. v. 12, n. 3, p. 1-15, 2022.

Gazineo, J. L. D. *et al.* Aminoglicosídeos no século 21: Revisão e atualização, com ênfase na nefrotoxicidade. **SAÚDE DINÂMICA**, v. 5, n. 2, p. 57–76, 2023.

Gomes, E. M. C. *et al.* Efeito inibitório in vitro de extratos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume no controle de *Cylindrocladium candelabrum*. **Ciência Florestal**. v. 28, n. 4, p. 1559-1567, 2018.

Haindongo, E. H. *et al.* Antimicrobial resistance prevalence of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* amongst bacteremic patients in Africa: a systematic review. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. v. 32, p.35-43, 2023.

Oliveira, M.G., Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da casca do caule de *Himatanthus drasticus* (mart.) plumel (Apocynaceae)

Henrique, H. C. *et al.* Prospecção fitoquímica e modulação da atividade antibiótica de *Cyperus rotundus* L. contra bactérias multirresistentes. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 23, n. 2, 2018.

Hernández, A. R. F. *et al.* Estudio de los compuestos esteroidales de las hojas y frutos de *Solanum sisymbriifolium* Lam (Joá, Juá, Jurubeba), Solanaceae. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 24, n. 3, p. e793, 2019.

Khan, A.; Miller, W. R.; Arias, C. A. Mechanisms of antimicrobial resistance among hospital-associated pathogens. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. v. 16, n. 4, p. 269-287, 2018.

Knop, L. B. & Maria, D. A. Métodos Substitutivos e a Experimentação Animal: um Enfoque Inovador. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**. v. 4, n. 2, 101-14, 2016.

Koch, I. *et al.* Apocynaceae. Lista de espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2016.

Kowalski, L. *et al.* Atividade Antimicrobiana de Flavonoides: uma Revisão de Literatura. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**. v. 4, n. 1, p. 51-65, 2020.

Kumar, A.; Khan, F.; Saikia, D. Exploration of Medicinal Plants as Sources of Novel Anticandidal Drugs. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v. 19, n. 28, p. 2579–2592, 2019.

Leandro, C. S. *et al.* Phytochemical prospection and larvicidal bioactivity of the janaguba (*Himatanthus drasticus*) Mart. Plumel (Apocynaceae) latex against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Brazilian Journal of Biology**. v. 83, p. e270143, 2023.

Leite, G. O. *et al.* Gastroprotective effect of medicinal plants from Chapada do Araripe, Brazil. **Journal of Young Pharmacists**. v.1, n. 1, p. 54, 2009.

Lima, M. F. F. *et al.* Avaliação toxicológica através do bioensaio com *Artemia salina* Leach de espécimes vegetais pertencentes à caatinga / Toxicological evaluation by *Artemia salina* Leach bioassay of caatinga plant specimens. **Brazilian Journal of Health Review**. v. 2, n. 6, p. 5950-5963, 2019.

Lima, C. C; Benjamim, S. C. C.; Santos, R. F. S. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão / Mecanismo de resistencia bacteriana frente a los fármacos: una revisión / Bacterial resistance mechanism against drugs: a review. **CuidArte, Enferm**. v. 11, n. 1, p. 105-113, 2017.

Oliveira, M.G., Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da casca do caule de *Himatanthus drasticus* (mart.) plumel (Apocynaceae)

Lopes, M. S. P. *et al.* Avaliação do efeito Gastroprotetor/ Gastrocicatrizante e de Parâmetros Toxicológicos do extrato etanólico de *Himatanthus sucuuba*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 23, p. 221-230, 2021.

Lorenzi, H. & Matos, F. J. A. (2021). **Plantas medicinais no Brasil**. (3a ed.). Nova Odessa-SP: Jardim Botânico Plantarum. 576p.

Lucetti, D. L. *et al.* Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of Inflammation**. v. 7, n. 1, p. 1-11, 2010.

Macêdo, D. *et al.* Versatility and consensus of the use of medicinal plants in an area of cerrado in the Chapada do Araripe, Barbalha-CE-Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 10, n. 31, p. 505-514, 2016.

Macêdo, M. J. F. *et al.* Fabaceae medicinal flora with therapeutic potential in Savanna areas in the Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.28, p. 738-750, 2018.

Mateo, N.; Nader, W.; Tamayo, G. Bioprospecting. **Encyclopedia of biodiversity**. v. 1, p. 471-487, 2001.

Matos, M. P. V. *et al.* Ethnopharmacological use and pharmacological activity of latex from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Int. J. Ind. Med. Plant**. v. 29, p. 1122-1131, 2013.

Matos, F. J. A.; Oliveira, F. *Lippia sidoides* Cham. – Farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmácia**. v.79, p. 84-87, 1997.

Melo, A. C. O.; Bonilla, O. H.; Lucena, E. M. P. Latex of Apocynaceae family plants: A review. **Research, Society and Development**. v. 10, n. 8, p. e13910817192, 2021.

Meyer, B.N. *et al.* Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**. v. 45, p. 31-34, 1982.

Mohammed, A.E. *et al.* Chemical Diversity and Bioactivities of Monoterpene Indole Alkaloids (MIAs) from Six Apocynaceae Genera. **Molecules**. v. 26, n. 2, p. 488, 2021.

Morais, F. S. *et al.* Insecticidal Compound from *Himatanthus drasticus* Latex against Cowpea Infestation by *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 69, n.17, p. 5049-5058, 2021.

Morais, F. S. *et al.* Chemical profiling of secondary metabolites from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel latex with inhibitory action against the enzymes  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase: In vitro and in silico assays. **Journal of ethnopharmacology**. v. 253, p. 112644, 2020.

Oliveira, M.G., Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da casca do caule de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae)

Moro, M. F. *et al.* Vegetação, unidades fitoecológicas e diversidade paisagística do estado do Ceará. **Rodriguésia**. v. 66, n. 3, 717-743, 2015.

Moura, D. F. *et al.* Evaluation of the cytotoxicity, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of the latex extracted from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae). **Journal of ethnopharmacology**. v. 253, p. 112567, 2020.

Mousinho, K. C. *et al.* Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel—Apocynaceae. **Journal of ethnopharmacology**. v. 137, n. 1, p. 421-426, 2011.

Munita, J. M.; Arias, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens**. p. 481–511, 2016.

Murray, C. J. L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet**. v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.

Nascimento, E. M. *et al.* Estudo fitoquímico e potencial antibacteriano do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Biota Amazônia**. v. 8, n.4, 28-32, 2018.

Oliveira, D. R. D. *et al.* Ethnopharmacological usage of medicinal plants in genitourinary infections by residents of Chapada do Araripe, Crato, Ceará—Brazil. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**. v. 25, n. 3, p. 279-286, 2012.

Oliveira, M. *et al.* Resistência bacteriana pelo uso indiscriminado de antibióticos: Uma questão de saúde pública. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**. v. 6, n. 11, p. 183–201, 2020.

Oliveira, R. X. *et al.* Resistência antimicrobiana na pneumonia adquirida na comunidade: revisão de literatura. **VITTALLE - Revista de Ciências da Saúde**. v. 33, n. 3, p. 76–88, 2021.

Pedrollo, C. T. *et al.* Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 186, p. 111–124, 2016.

Pereira, A. M. V. *et al.* Ethnoknowledge associated with the use of latex from janaúba (*Himatanthus Drasticus* (Mart.) Plumel) and its reflections on the marketing of its pharmacological formulations. **Research, Society and Development**. v. 11, n. 4, p. e40811427010, 2022.

Pinheiro, R. S. P. *et al.* Gastroprotective effects of latex from *Himatanthus drasticus* in models of acute gastric lesion. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. v.42, p. 1-12. 2013.

Oliveira, M.G., Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da casca do caule de *Himatanthus drasticus* (mart.) plumel (Apocynaceae)

Prates, A. P. L.; Irving, M. A. Conservação da biodiversidade e políticas públicas para as áreas protegidas no Brasil: desafios e tendências da origem da CDB às metas de Aichi. **Revista Brasileira de Políticas Públicas**. v. 5, n. 1, p. 27-57, 2015.

Rapini, A. Taxonomy “under construction”: advances in the systematics of Apocynaceae, with emphasis on the Brazilian Asclepiadoideae. **Rodriguesia**. v.63, n.1, p.75-88, 2012.

Rempel C. *et al.* Efeito antimicrobiano de plantas medicinais: uma revisão de estudos científicos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**. v. 10, n. 4, p. 57-82, 2019.

Reza, A.; Sutton, J.M.; Rahman, K.M. Effectiveness of efflux pump inhibitors as biofilm disruptors and resistance breakers in gram-negative (ESKAPEE) Bacteria. **Antibiot**. v. 8, p. 2–19, 2019.

Ribeiro, K. T. *et al.* Impactos do Programa Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade (Sisbiota Brasil). **Revista Parcerias Estratégicas - CGEE**. v. 24, n. 48, p. 119–132, 2019.

Ribeiro, D. A., *et al.* Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.155 n.3, p. 1522-1533, 2014.

Ribeiro-Silva, S. *et al.* Angiosperms from the Araripe national forest, Ceará, Brazil. **Check list**. v. 8, p. 744. 2012.

Rocha, J. F. *et al.* Uso da receita popular do látex comercial de janaguba (*Himatanthus drasticus*) em ensaios anti-inflamatórios e antimicrobianos. **Revista Farmácia Generalista**. v. 2, n. 1, p. 1-17, 2020.

Rodrigues, F. C. *et al.* Antimicrobial activity, modulatory effect and phytochemical analysis of *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). **South Afr. J. Bot.** v.147, p. 286–293, 2022.

Romm, A. J. (1999). Cura natural para bebês e crianças. São Paulo-SP: Editora Ground, 299p.

Salehi, B. *et al.*, Antioxidant, antimicrobial, and anticancer effects of *Anacardium* plants: An ethnopharmacological perspective. **Frontiers in Endocrinology**. v. 11, p. 295, 2020.

Santos, A. F. dos. *et al.* Review of three medicinal and ornamental species of the family Apocynaceae Juss. **Research, Society and Development**. v. 11, n. 2, p. e1011224876, 2022.

Santos, D. I, *et al.* Caracterização fitoquímica e atividade antibacteriana do extrato etanólico e óleo essencial das folhas de *cymbopogon citratus*. **Revista Uningá**, v. 1, p. eUJ3406, 2021.

Oliveira, M.G., Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da casca do caule de *Himatanthus drasticus* (mart.) plumel (Apocynaceae)

Santos, G. J. L. *et al.* *Himatanthus drasticus* (Apocynaceae) latex reduces oxidative stress and modulates CD4+, CD8+, FoxP3+ and HSP-60+ expressions in Sarcoma 180-bearing mice. **Journal of ethnopharmacology**. v. 220, p. 159-168, 2018.

Santos, G. J. L. *et al.* Involvement of mast cells, CD68+ and VEGF+ expressions in response to *Himatanthus drasticus* commercial latex in mice wound healing model. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 69, p. 513-522, 2017.

Scaldeferri, L. *et al.* Formas de resistência microbiana e estratégias para minimizar sua ocorrência na terapia antimicrobiana: Revisão. **Pubvet**. v. 14, n. 8, p. 163, 2020.

Silva, D. H. S. *et al.* Bioprospecting as a strategy for conservation and sustainable use of the Brazilian Flora. **Biota Neotropica**. v. 22, p. e20221356, 2022.

Silva, L. E.; Dotto, A. R. F; Rebelo, R. A. Bioprospecção e Inovação na Floresta Atlântica: a atuação da REBIFLORA no Litoral do Paraná e Santa Catarina. **Revista Fitos**. v.2, p. 227-237, 2022.

Silva, M. P. *et al.* Protective effect of Amazonian *Himatanthus sucuuba* extracts in *Drosophila melanogaster* exposed to Paraquat. **Research, Society and Development**. v. 11, n. 17, p. e148111738931, 2022.

Silva, M.G. *et al.* A importância dos testes de toxicidade para o desenvolvimento e registro de fitoterápicos. **Research, Society and Development**. v. 10, n. 12, p. e538101220137, 2021.

Silva, T. F.; Oliveira, A. B. Plantas leishmanicidas da Amazônia Brasileira: uma revisão. **Revista Fitos**. v. 10, n. 3, p. 339–363, 2017.

Silveira, G. P. *et al.* Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**. v. 29, n. 4, p. 844, 2006.

Soares, F. P. *et al.* Estudo etnofarmacológico e etnobotânico de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (janaguba). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 17, n. 4, p. 900–908, 2015.

Sousa, J. F.O. *et al.* Composição florística de duas áreas de Caatinga da Chapada do Araripe. **Research, Society and Development**. v.10, n. 13, p. e506101321398, 2021.

Sousa-Júnior, J. R. *et al.* Traditional management affects the phenotypic diversity of fruits with economic and cultural importance in the Brazilian Savanna. **Agroforestry Systems**. v. 92, n. 1, p. 11-21, 2018.

Souza, V. C., & Lorenzi, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG IV. **Jardim Botânico Plantrum**. v. 4, p.1-768, 2019.

Oliveira, M.G., Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano de extratos da casca do caule de *Himatanthus drasticus* (mart.) plumel (Apocynaceae)

Sousa, E. L. *et al.* Antitumor activity of leaves of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (janaguba) in the treatment of Sarcoma 180 tumor. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 46, n. 2, p. 199–203, 2010.

Spellberg B. The New Antibiotic Mantra -“Shorter Is Better”. **JAMA InternMed**. v.176, n. 9, p, 1254–1255, 2016.

Stehmann J. R.; Sobral, M. Biodiversidade no Brasil. In: Simões CM, Schenkel EP, Mentz LA, Petrovick PR, editores. **Farmacognosia do Produto Natural ao Medicamento**. v. 1, p. 1-11, 2017.

Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artemed 12 ed., 2017. 935 p.

Ullah, A. *et al.* Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. **Molecules**. v. 25, n. 22, p. 5243, 2020.

Vieira, L. S. (1992). Fitoterapia da Amazônia - Manual das plantas medicinais: a farmácia de Deus. Edição: 2. São Paulo-SP: **Editora Agronômica Ceres**. 347p.

Vieira, L. S. *et al.* Plantas medicinais conhecidas por especialistas locais de uma comunidade rural maranhense. **Revista brasileira de plantas medicinais**. v. 17, n. 4, p. 1061-1068, 2015.

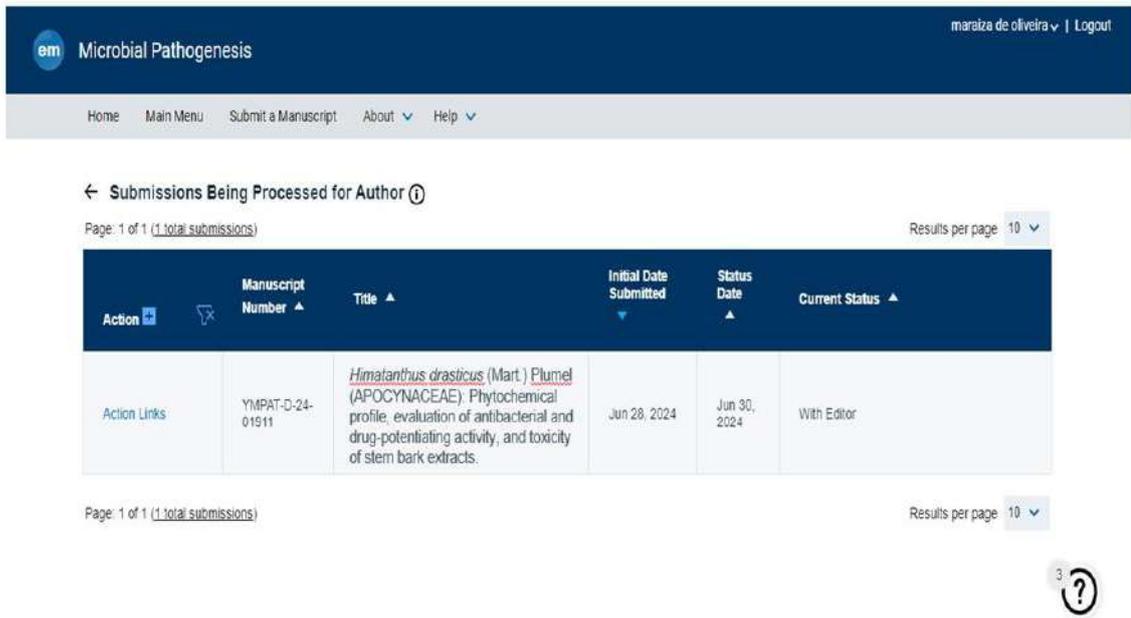
Wang, Y. *et al.* Evolution of 101 Apocynaceae plastomes and phylogenetic implications, **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 180, p. 107688, 2023.

WHO. World Health Organization. Antimicrobial Resistance (AMR) - Key facts, Novembre 21, 2023. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/antimicrobial-resistance> (Acessado em 13 de janeiro de 2024).

WHO. World Health Organization, (2022). Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report. Available online: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240027336> (acessado em 10 novembro 2023).

Zhong, L. *et al.* Análise diferencial de trajetórias de subida geotáxica negativas em *Drosophila* sob diferentes condições. **Arquivos de Bioquímica e Fisiologia de Insetos**, v.111, p. e21922, 2022.

## ANEXO A: COMPROVANTE DE SUMISSÃO DE ARTIGO DA DISSERTAÇÃO

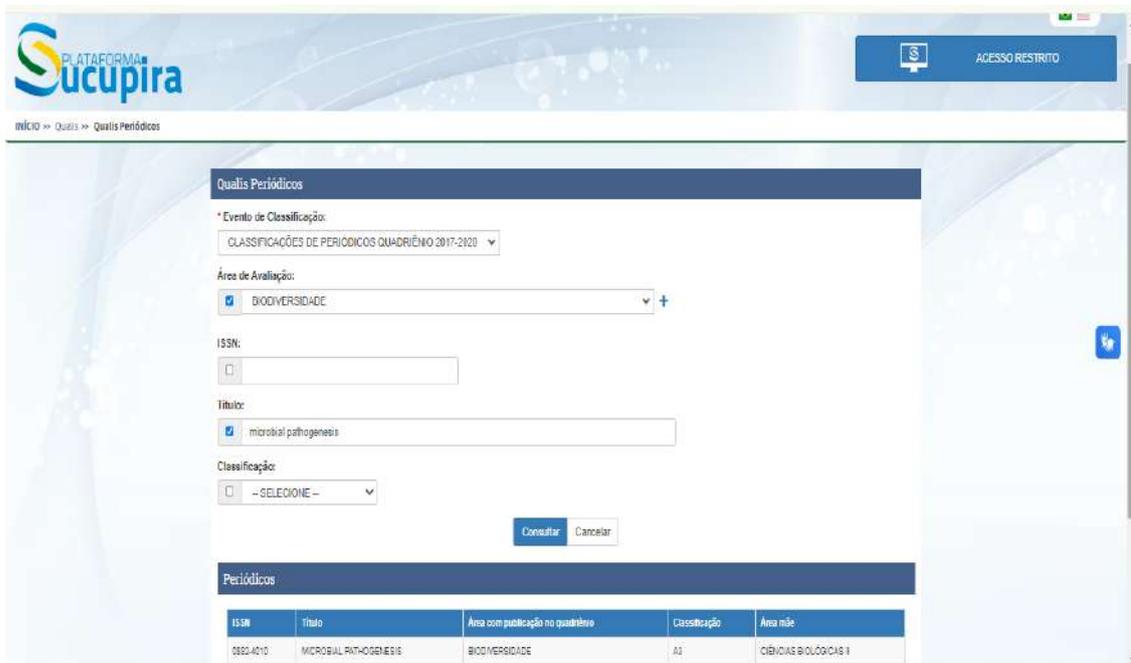


The screenshot shows the submission portal for the journal *Microbial Pathogenesis*. The user is logged in as 'mariza de oliveira'. The page displays 'Submissions Being Processed for Author' with one submission listed. The submission details are as follows:

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	YMPAT-D-24-01511	<i>Himatanthus drasticus</i> (Mart.) Plumel (APOCYNACEAE). Phytochemical profile, evaluation of antibacterial and drug-potentiating activity, and toxicity of stem bark extracts.	Jun 28, 2024	Jun 30, 2024	With Editor

## ANEXO B: COMPROVANTE DE QUALIS VIGENTE NA ÁREA DE BIODIVERSIDADE

Para o quadriênio 2017-2020, na área de **Biodiversidade**, a revista "Microbial Pathogenesis" foi classificada como **A3**. Com percentil SCORPUS de 70%.



The screenshot shows the Sucupira platform interface for searching journal classifications. The search criteria are:

- Evento de Classificação: CLASSIFICAÇÕES DE PERIÓDICOS QUADRIÊNIO 2017-2020
- Área de Avaliação:  BIODIVERSIDADE
- ISSN:
- Título:  microbial pathogenesis
- Classificação:  -SELECIONE--

Buttons: Consultar, Cancelar

ISSN	Título	Área com publicação no quadriênio	Classificação	Área mãe
0882-4010	MICROBIAL PATHOGENESIS	BIODIVERSIDADE	A3	CIBINAS BIOLÓGICAS I