

UNIVERSIDADE ANHANGUERA - UNIDERP

FERNANDA SOLLBERGER CANALE

**AÇÃO FUNGICIDA E BACTERICIDA DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE
Richardia brasiliensis GOMES**

CAMPO GRANDE – MS

2012

FERNANDA SOLLBERGER CANALE

**AÇÃO FUNGICIDA E BACTERICIDA DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE
Richardia brasiliensis GOMES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em nível de Mestrado Acadêmico em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional da Universidade Anhanguera-Uniderp, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional.

Orientação:

Profa. Dra. Rosemary Matias

CAMPO GRANDE – MS

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Anhanguera – Uniderp

C22a Canale, Fernanda Sollberger.
Fungicida e bactericida de extratos e frações de *Richardia brasiliensis*
Fernanda Sollberger Canale. -- Campo Grande, 2013.
73f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Anhanguera - Uniderp, 2013.
“Orientação: Profa. Dra. Rosemary Matias.”

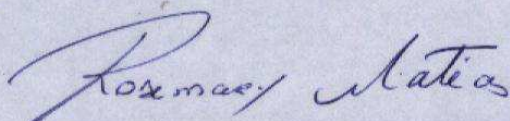
1. Rubiaceae 2. Metabólitos secundários 3. Microorganismos
patogênicos I. Título.

CDD 21.ed. 581.8

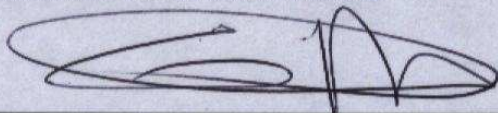
FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidata: **Fernanda Sollberger Canale**

Dissertação defendida e aprovada em 27 de setembro de 2012 pela Banca Examinadora:



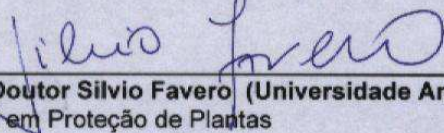
Prof. Doutora Rosemary Matias (Orientadora)
Doutora em Química dos Produtos Naturais



Prof. Doutor Guilherme Mallmann (Embrapa Gado de Corte)
Doutor em Fitopatologia



Prof. Doutora Denise Renata Pedrinho (Universidade Anhanguera-Uniderp)
Doutora em Produção Vegetal



Prof. Doutor Silvio Favero (Universidade Anhanguera-Uniderp)
Doutor em Proteção de Plantas

*Dedico este trabalho à minha família, em
especial ao meu marido, Rafael.*

AGRADECIMENTOS

Ao coordenador do Programa, Prof. Dr. Silvio Favero, que soube me apoiar e me entender, mesmo que de longe, mas do seu jeito, quando mais precisei.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosemary Matias, pela disponibilidade em me orientar, pelos conhecimentos transmitidos, pelo incentivo para que este trabalho fosse finalizado com êxito. Agradeço suas palavras de apoio, seu conhecimento inigualável, sua paciência e persistência.

Aos meus pais, Ângela M. Lôbo Sollberger e Antonio M. Canale Filho, que estiveram sempre ao meu lado e me ensinaram tudo o que sei e o que sou hoje.

Ao meu marido, Rafael C. Arnaldi, que nunca saiu do meu lado, pelas palavras amigas, pelo conforto nos momentos de angústia e por cuidar sozinho do nosso filho, todos os finais de semana, mesmo nos primeiros dias de vida.

Ao meu filho, Eduardo Canale Arnaldi, meu maior presente destas aulas. Este que veio no meio de tantos trabalhos e hoje só me traz alegrias e forças para finalizá-lo.

Aos meus sogros, Iraci Cazzolato Arnaldi e José Luis M. de Freitas, as pessoas que mais insistiram para que eu tentasse entrar no Programa, sem suas palavras não teria feito minha inscrição.

Aos membros da banca por aceitarem o convite.

Aos alunos do curso de Nutrição da Universidade Anhanguera-Uniderp que entenderam e apoiaram as ausências de sua coordenadora.

Às técnicas Karen e Hellen, pela ajuda e parceria nas partes práticas do trabalho.

À Universidade Anhanguera-Uniderp que incentiva o crescimento e aprimoramento de seus funcionários, me dispensando todas às sextas-feiras para que pudesse cumprir meus créditos.

Aos colegas de turma que fizeram nossos estudiosos finais de semana mais leves e divertidos.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse finalizado.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| AGRADECIMENTOS | vi |
| LISTA DE FIGURAS | VIII |
| LISTA DE TABELAS | IX |
| RESUMO | X |
| ABSTRACT | XI |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 CAPÍTULO I | 3 |
| 2.1 REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 15 |
| 3 CAPÍTULO II - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DO EXTRATO E FRAÇÕES DA PARTE AÉREA DE <i>Richardia brasiliensis</i> GOMES ²⁴ | |
| 3.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 39 |
| 4 CAPÍTULO III: CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO QUÍMICO DE R. brasiliensis GOMES E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA | 43 |
| 4.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 62 |

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO II

Figura 1: Porcentagem de atividade antioxidante do EX_{EtOH} e das frações (F_{Hex} , F_{Acoet} e $F_{H/MeOH}$) das partes aéreas (folhas e caule) de *R. brasiliensis* e do BHT (butilhidroxitolueno) no tempo de 30 min.....33

Figura 2: Gráficos 1 compostos fenólicos e Grafico 2 flavonoides totais do EX_{EtOH} e das frações (F_{Hex} , F_{Acoet} e $F_{H/MeOH}$) das partes aéreas (folhas e caule) de *R. brasiliensis*.....34

CAPITULO III

Figura 1: Estrutura do β -sitosterol (F_1) e estigmaterol (F_2) isolados da fração hexânica das partes aéreas de *R. brasiliensis*.....51

Figura 2: Estrutura dos triterpenos ácido oleanólico (F_3) e ácido ursólico (F_4) e isolados das partes aéreas de *R. brasiliensis*.....51

Figura 3: Gráfico representa a análise de co-variância entre o tipo de tratamento e dosagem utilizada em relação ao crescimento micelial (cm) de *Colletotrichum gloeosporioides*. EtOH = Extrato etanólico bruto; Hex= Fração Hexânica; Puro= fração pura = ácido oleanólico.....52

Figura 4: Gráfico representa a análise de co-variância entre o tipo de tratamento e dosagem utilizada em relação ao crescimento micelial (cm) de *Lasiodiplodia theobromae*. EtOH = Extrato etanólico bruto; Hex= Fração Hexânica; Puro= fração pura = ácido oleanólico.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Medida dos halos de inibição (mm) obtidos no teste de difusão em ágar com o extrato etanólico (EX_{EtOH}) e das frações (F_{Hex}, F_{Acet} e F_{H/MeOH}) das partes aéreas (folhas e caule) de *R. brasiliensis* frente às cepas *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*.....35

Tabela 2: Concentração Mínima Inibitória (CMI) do extrato e frações observada frente à bactéria *Staphilococcus aureus* (ATCC 29213).....37

RESUMO

As plantas são importantes fontes de substâncias biologicamente ativas. A família Rubiaceae vem sendo aos poucos explorada e dentre as plantas dessa família destaca-se a *Richardia*, que é uma planta invasora que provoca tanto problemas em lavouras quanto degradação de pastagens. Sua natureza invasiva poderá levá-la a extinção, impedindo desta forma o estudo farmacológico e fitoquímico de uma espécie ainda pouco estudada. Considerando a escassez de informações, este trabalho teve o objetivo de analisar o potencial antibacteriano e antifúngico da *R. brasiliensis* em dois fungos de frutas de grande consumo populacional e em quatro bactéria comumente causadora de DTA (Doenças Transmitidas por Alimentos), e ainda contribuir para o estudo químicos desta planta, isolando seus composto metabólicos, Com os resultados obtidos, observa-se que *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae) apresenta atividade antimicrobiana frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus*, identificou-se atividade antioxidante que deve estar ligada a presença dos compostos fenólicos e flavonóides na fração acetato de etila e para a fração hexânica os esteróides e triterpenos. De acordo com as substâncias isoladas e frente aos ensaios realizados *in vitro* com o extrato etanólico e frações de *R. brasilienses*, conclui-se que o extrato etanólico e a fração pura em concentrações iguais e superiores a 160 µg/100mL surge como uma alternativa para o controle do fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Lasiodiplodia theobromae*.

Palavras-chave: Rubiaceae; Metabólitos secundários; Microorganismos patogênicos.

ABSTRACT

Plants are important sources of biologically active substances. The family Rubiaceae has been gradually explored. This family, is a plant that causes problems both on farms and grassland degradation, due to its invasive nature, which may lead to the extinction of the species still little studied pharmacologically and phytochemically. Economically, the food industry has been seeking to increase the shelf life of products. In contrast, the increased knowledge of the additives has put food security under suspicion. The study of the biological activity of secondary metabolites in crude extracts or essential oils of plants contributes as an effective way to control diseases in cultivated plants. The Food borne diseases are a major public health problem in Brazil and worldwide. Considering the lack of information, this study aimed to analyze the potential antifungal and anti-pathogenic of *R. brasiliensis*, can contribute in the area of health and food industry to reduce costs and use of a weed, decreasing or inhibiting the action of microorganisms.

Key-words: Rubiaceae, Secondary metabolites, Microorganisms.

1. INTRODUÇÃO

A família Rubiaceae vem sendo aos poucos explorada, seja por espécies de alto valor econômico, como a *Psychotria ipecacuanha* (medicinal) e a *Gardenia jasminoides* (ornamental), seja por espécies tóxicas como a *Palicourea marcgravii* ou infestantes como a *Richardia brasiliensis* (KISSMANN, GROTH, 2000).

Entre as plantas desta família, coloca-se em destaque a *Richardia brasiliensis*, cujos estudos encontrados na literatura estão voltados à área do agronegócio, devido a sua característica invasora de diversas lavouras, sua facilidade em se adaptar aos diferentes sistemas de plantio (direto e convencional), gerando sérios problemas por competir com a cultura e ser de difícil controle (PEDRINHO JUNIOR *et al.*, 2004).

Na medicina popular a infusão ou o decocto das raízes de *R. brasiliensis* é empregada como expectorante, emética, diaforética, expectorante (GRANDI *et al.*, 1989), vermífuga e para o tratamento de hemorróidas (AGRA *et al.*, 2007). Das atividades biológicas descritas para a espécie destaca-se a antimicrobiana (FIGUEREDO *et al.*, 2009) e antiviral (SIMÕES *et al.*, 1999).

Em Mato Grosso do Sul os estudos com a *R. brasiliensis* estão voltados para a área agrônômica (ADEGAS *et al.*, 2010; GUGLIERI-CAPORAL *et al.*, 2011). Além de planta invasora é citada como uma das espécies da flora apícola na região de Dourados, Mato Grosso do Sul (D'APOLITO *et al.*, 2010).

Como planta invasora a *R. brasiliensis* provoca tanto problemas nas lavouras quanto degradação nas pastagens. Em razão de sua natureza invasiva, esta planta está sendo eliminada sistematicamente por meio de herbicidas específicos (MONQUERO *et al.*, 2005; MONQUERO; CHRISTOFFOLETI, 2003; GOMES *et al.*, 2008), o que pode levar à extinção da espécie ainda pouco estudada farmacologicamente e fitoquimicamente.

Os estudos fitoquímicos para as espécies de diferentes regiões brasileiras demonstram a presença de flavonóides, triterpenos, cumarinas e ácidos fenólicos para amostras da região (PINTO *et al.*, 2008). Nas partes aéreas procedentes do Rio Grande do sul foram identificados cumarinas,

resinas, esteróides, triterpenóides, flavonóides e alcalóides (FIGUEREDO *et al.*, 2009; FIGUEREDO *et al.*, 2010).

Esta pesquisa além de contribuir com a elucidação dos principais compostos presentes, considera ainda a possibilidade de verificar se há contribuições destes constituintes nas atividades investigadas e pode colaborar com um novo rumo ao manejo dessa espécie e possibilitar a descoberta de novas fontes de moléculas com atividade antimicrobiana.

Pesquisas que envolvam a busca de novas tecnologias para o desenvolvimento de drogas mais eficazes constituem uma estratégia promissora, já que possibilita a iniciativa de prospecção de novas classes de moléculas naturais, capazes de neutralizar ou de danificar o patógeno-alvo, contribuindo como modelo para a síntese de novos produtos.

Este trabalho é constituído por uma introdução geral, três capítulos e as considerações finais. O primeiro capítulo apresenta uma revisão de literatura contendo a descrição botânica da planta (família, gênero e espécie), uso popular, fitoquímica e ensaios biológicos, além da descrição da importância agrícola e os métodos de controle dos microorganismos. O segundo capítulo é representado por um artigo científico demonstrando parte dos resultados, sendo a análise antibacteriana e antioxidante de *R. brasiliensis* e a determinação de metabólitos secundários. O terceiro capítulo um segundo artigo científico com os resultados sobre o potencial fungicida e o isolamento químico da mesma planta. E finalizando o trabalho têm-se as considerações finais a respeito do tema.

Apesar dos trabalhos realizados com as partes aéreas e raízes de *R. brasiliensis* serem incipientes, e, ainda que a região possa influenciar na presença de metabólitos secundários e conseqüentemente na ação das espécies vegetais justifica-se a finalidade desta pesquisa que fundamenta-se em avaliar o potencial antimicrobiano do extrato e frações de *R. brasiliensis* frente à bactérias e fungos patogênicos.

2. CAPITULO I

2.1 REVISÃO DE LITERATURA

A utilização de fontes naturais é, há milhares de anos, uma prática comumente exercida pela humanidade, que engloba desde a alimentação até o tratamento de doenças. Os produtos naturais têm encontrado muitas aplicações e estudos nos campos da medicina, farmácia, biologia e nutrição. Sendo os compostos farmacêuticos mais importantes nos dias atuais os de origem vegetal e microbiana (OLIVEIRA, 2009).

O uso de plantas em doenças vem sendo relatado desde 4.000 a.C. Em 2.100 a.C. deu-se o primeiro registro médico, no Museu da Pensilvânia e já com uma coleção de fórmulas de trinta diferentes drogas de origem vegetal, animal ou mineral. Com data de 1.500 a.C. encontra-se 811 prescrições e 700 drogas no manuscrito Egípcio “*Ebers Papyrus*”. Em 500 a.C, os chineses relatam indicações de uso de plantas para tratamento de doenças. E até os dias atuais, algumas destas plantas são utilizadas pela indústria farmacêutica, como o Ginseng (*Panax spp*), *Ephedra spp*, *Cassia spp* e *Rheum palmatum L* (DUARTE, 2006).

As plantas são importantes fontes de substâncias biologicamente ativas, ou seja, substâncias que apresentam alguma atividade sobre o metabolismo de um organismo vivo (ROBBERS *et al.*, 1997).

No mundo há, aproximadamente, cerca de 250.000 espécies de plantas (BRASIL, 1998), fitoquimicamente muito pouco foi estudado e menos ainda foram analisadas farmacologicamente. Mesmo sabendo-se que uma quantidade considerável de compostos já foram investigados, isolados e suas estrutura química definida, suas atividades biológicas ainda não foram completamente avaliadas, seja em relação às suas funções para a própria espécie vegetal, seja quanto às suas potencialidades de interesse terapêutico (SILVA, 2007).

Empiricamente, há séculos, propriedades antimicrobianas em plantas são reconhecidas e somente foram, ou ainda, vem sendo, comprovadas, cientificamente, recentemente. Esta propriedade dá-se em função de substâncias presentes nos extratos e óleos essenciais produzidos pela planta como resultado do seu metabolismo secundário. Diversos países, nos últimos anos, relatam estas atividades em extratos e óleos de suas plantas nativas, tais como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, países estes que possuem uma flora diversificada e uma tradição na utilização de plantas medicinais (DUARTE, 2006), podendo ser entendido em função de tradições culturais e desenvolvimento econômico.

Além das propriedades antimicrobianas, Ribeiro (2008) ressalta a importância da ação fungitóxica presentes nas plantas em função de seus metabólitos secundários, seja esta ação direta no controle de doenças, causadas por fungos, em plantas cultivadas, ou por um aumento do nível de resistência às doenças da cultura.

Jakiemi (2008) cita o uso de óleos das plantas na indústria alimentícia, podendo estes atuar como antioxidantes e antibacterianos, além de reproduzir sabor e odor a planta. Coloca a incoerência entre estudos e utilização quando numera que cerca de 300 diferentes tipos de óleos essenciais são comercializados, apesar de serem conhecidos aproximadamente 3.000 tipos de óleos essenciais.

No Brasil encontra-se um número superior a 55.000 espécies de plantas descritas, o que equivale a 22% do mundo, um percentual importante para um único país, e talvez o patrimônio genético mais rico do mundo neste grupo (BRASIL, 1998). Além disso, muitas das espécies são endêmicas, e uma grande parcela de importância econômica mundial como o abacaxi, o amendoim, a castanha do Brasil (ou do Pará), a mandioca, o caju e a carnaúba (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2012).

Com uma extensão de mais de 8,5 milhões de km², o espaço geográfico brasileiro apresenta uma grande diversidade de clima, solo, vegetação e fauna (BRASIL, 1998), entretanto com toda essa extensão e complexidade, há uma perda desta biodiversidade em função de fatores como: destruição e fragmentação dos habitats; introdução de espécies e doenças exóticas;

exploração excessiva de espécies de plantas e animais, chegando ao nível da extinção; uso de híbridos e monoculturas na agroindústria e nos programas de reflorestamento; contaminação do solo, água e atmosfera por poluentes, e mudanças climáticas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2012).

Este paradoxo traz à tona uma idéia premente: é fundamental que o Brasil intensifique as pesquisas em busca de um melhor aproveitamento da biodiversidade brasileira – ao mesmo tempo mantendo garantido o acesso aos recursos genéticos exóticos, também essenciais ao melhoramento da agricultura, da pecuária, da silvicultura e da piscicultura nacionais (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2012).

Das plantas terrestres o grupo mais importante é o das angiospermas, econômica e ecologicamente, além de ser o grupo mais diversificado em número de espécies (BRASIL, 1998). Dada sua diversidade faz-se primordial sua preservação, utilização sustentável e pesquisa, porém existe certa dominância de algumas famílias, quais sejam: Asteraceae (1.900 espécies), Fabaceae (1.800 espécies), Euphorbiaceae (1.100 espécies), Rubiaceae (1.010 espécies), Myrtaceae (820 espécies), Caesalpiniaceae (790 espécies) e Mimosaceae (580 espécies) (SILVA, 2007).

A família Rubiaceae, considerada a quarta maior família de angiospermas do Brasil (PEREIRA; BARBOSA, 2004), possui cerca de 13.000 espécies (LIMA *et al.*, 2009), 637 gêneros, classificadas em quatro subfamílias (Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirrhoideae e Rubioideae) e 44 tribos (OLIVEIRA *et al.*, 2009), sendo que mais de 75% desta família crescem em regiões tropicais (CHIQUIERI; *et al.*, 2004). No Brasil, está representada por 18 tribos, 101 gêneros e 1.010 espécies (OLIVEIRA, 2004).

Rubiaceae é conhecida por sua importância econômica, seu principal representante é o café (*Coffea arabica*), e por sua relevância terapêutica, sendo amplamente utilizada na fabricação de fitofármacos e fitoterápicos. Diversos estudos com as espécies desta família apontaram uma grande diversidade de metabólitos secundários com alto potencial biológico (OLIVEIRA, 2009).

Um estudo fitoquímico de uma espécie caracteriza seus constituintes químicos, podendo ser utilizados de diversas formas, em especial na farmacologia. Alguns exemplos mais comuns são as substâncias derivadas de fenóis, que apresentam atividades anti-sépticas e desinfetantes, sendo, encontradas em diversos produtos comerciais, como sabões, desodorantes, desinfetantes e soluções de gargarejo (SANTOS, 2008).

Diversas espécies apresentam alto valor econômico, como a *Psychotria ipecacuanha* (medicinal) e a *Gardenia jasminoides* (ornamental), enquanto outras possuem aspectos negativos, como plantas tóxicas (*Palicourea marcgravii*) ou infestantes (*Richardia brasiliensis* Gomes) (KISSMANN; GROTH, 2000).

A *R. brasiliensis* Gomes conhecida popularmente como “ervanço”, “poaia-branca” e “ipeca” (TENÓRIO-SOUZA, 2011), “ervabotao” (ADOLPHO *et al.*, 2008) pertencente a família Rubiaceae, e uma planta anual nativa da América do Sul, ocorrendo desde a Cordilheira dos Andes até a Costa Atlântica. No Brasil, tem vasta distribuição geográfica, com maior ocorrência em regiões agrícolas do Centro-Oeste, Sudeste e Sul (ROSSETO *et al.*, 1997). Utilizada na medicina popular como antiemética, no tratamento de diabetes (ADOLPHO *et al.*, 2008), expectorante, diaforética (FIGUEIREDO *et al.*, 2010), antihemorroidal e vermífuga, além de ser empregada na cura de eczema e no tratamento de queimaduras (TENÓRIO-SOUZA, 2011).

Segundo Kissmann; Groth (2000) e Rosseto *et al.*, (1997) *R. brasiliensis* é uma espécie cosmopolita, que infestam espontaneamente áreas agrícolas e de pastagens, porém na África, em especial na Nigéria, é utilizada na medicina popular no tratamento de eczema e malária.

Caracterizada como planta daninha bastante frequente no território nacional, a *R. brasiliensis* oferece competição especialmente no início das culturas anuais de verão, infestando principalmente áreas de lavouras, destaca-se as plantações de soja e milho das regiões Sul e Centro-Oeste, pomares, cafezais, culturas perenes, jardins e terrenos baldios. Tolerância a certo grau de sombreamento, causando problema até na operação de colheita, devido à sua grande massa vegetativa cobrindo completamente o solo, à semelhança de um tapete (LORENZI, 2000; KISSMANN; GROTH, 2000).

Segundo Figueiredo *et al.*, (2009) a *R. brasiliensis* é uma planta anual, herbácea, prostada, ramificada, de caule densamente hirsutopubescente, medindo 30-70 cm de comprimento, suas folhas são simples e opostas. O pecíolo é curto ou quase ausente. Suas flores são brancas e se reúnem em inflorescências glomerulares achatadas, terminais, o fruto é uma cápsula oboval-trígona, com 2-4 mm de comprimento.

Quanto a classe de metabólitos secundários nesta há divergência na literatura consultada segundo Adekunle (2000), o extrato do aquoso de *R. brasiliensis* contém principalmente o tanino e o extrato etanólico antraquinonas, flavonoides, saponinas e esteróides enquanto que alcalóide e os terpenos foram ausentes.

Os metabólitos secundários por não serem necessário para todas as plantas, nem para que esta planta complete seu ciclo de vida, origina compostos que não possuem uma distribuição padrão e, por isso, esses compostos podem ser utilizados em estudos taxonômicos, porém desempenha funções importantes na interação das plantas com o meio ambiente. Possuem também ação protetora em relação a mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição aos raios ultravioleta (UV) e deficiência de nutrientes minerais. Os metabólitos secundários dividem-se em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. (JAKIEMIU, 2008)

Milanese *et al.* (2005) verificaram que o extrato aquoso de *Richardia brasiliensis*, coletadas em Mato Grosso do Sul apresentou ensaio positivo para: saponinas e cumarinas, compostos fenólicos e taninos, já para o extrato etanólico evidenciou a presença de: cumarinas, esteróides e triterpenos livres, compostos fenólicos, tanino e alcalóide.

Edeoga *et al.* (2005) analisaram amostras de *Richardia brasiliensis*, procedente da Nigéria e detectaram a presença de alcalóides, taninos, saponinas, esteroides, terpenos, flavonoides e glicosídios cardiotônicos.

Adolpho e Dalcol (2008) realizaram testes qualitativos fitoquímicos das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol e constataram a presença de alcalóides, núcleos triterpenoidais, esteroidais, compostos

fenólicos e flavonóides. Isolaram, também, β -sitosterol e β -sitosterol livre, além do triterpeno ácido ursólico.

Com relação aos ensaios antimicrobianos apenas Correa *et al.*, (2005) avaliaram o extrato etanólico de *R. brasiliensis* da região de Goiás frente as cepas *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphilococcus áureos* (ATCC 29737), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), sendo que destas bactérias apenas a *S. aureos* apresentou resultado positivo.

Mais recentemente Pinto *et al.*, (2008) reportaram o isolamento e identificação estrutural de um flavonóide glicosilado, um triterpeno, uma cumarina e dois derivados de ácido benzóico, sejam eles: isorametina-3-O-rutinosídeo, ácido oleanólico, a cumarina escopoletina e os ácidos *p*-hidroxibenzóico e *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzóico.

As cumarinas são metabólitos secundários, distribuídos no reino vegetal, também encontradas em fungos e bactérias, com atividade biológica, como antimicrobiana, antiviral, antiinflamatória, antitumoral e antioxidante (KABEYA *et al.*, 2012). Os taninos são usados como agentes antimicrobianos em geral (fungicidas e antibacterianos) (SILVA, 1999). Os alcalóides são derivados de plantas que agem sobre o sistema nervoso central e aparelhos nervosos periféricos. As saponinas funcionam no corpo como detergente natural, limpando o sangue e os rins das toxinas. Os esteróides formam um grande grupo de compostos lipossolúveis amplamente distribuídos nos organismos vivos, destaque aos hormônios sexuais, vitamina D e os esteróis como o colesterol (KABEYA *et al.*, 2012).

A busca para uma melhor conservação dos alimentos é uma preocupação desde os tempos pré-históricos, onde o uso de calor, frio, secagem e fermentação eram e talvez ainda sejam os mais tradicionais, porém a indústria de alimentos moderna vem fazendo uso extensivo de aditivos químicos. A principal necessidade destas indústrias é a conservação, que faz com que procedimentos de inativação de microorganismos, prevenção ou diminuição de crescimento, sejam empregados (ALMEIDA, 2007).

Oliveira *et al.*, (2009) ressaltam que, embora o Brasil seja o terceiro maior produtor mundial de frutas frescas, porém este continua com uma inexpressiva entrada no mercado internacional.

Nascimento, (1990) destaca a rica flora do continente americano e os poucos trabalhos que avaliam as plantas quanto a sua atividade microbiana. Esta capacidade, presente na maioria dos compostos isolados de drogas vegetais representa, de certa maneira, uma extensão do próprio papel que estes exercem, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos.

Economicamente, a indústria de alimentos busca aumentar o tempo de prateleira dos produtos, conservando o seu frescor, em contra partida o aumento do conhecimento dos aditivos vem colocando a segurança alimentar sob suspeita. Estas dificuldades geram aberturas para a pesquisa de novas alternativas, além da preferência do consumidos pro produtos “naturais” (ALMEIDA, 2007).

A pesquisa da atividade biológica de metabólitos secundários em extratos brutos ou óleos essenciais de plantas contribui como uma forma efetiva de controle de doenças em plantas cultivadas. Ribeiro (2008) relata que estes metabólitos presentes em folhas de algumas espécies vegetais são eficientes no controle de doenças de plantas, tanto por sua ação fungitóxica, como no aumento do nível de resistência às doenças. Chama a atenção para a área economia por serem estes produtos mais baratos que os fungicidas comercializados e ainda o baixo risco de intoxicação humana e poluição do meio ambiente, podendo, em muitos casos, serem obtidas na própria propriedade agrícola.

As reações bioquímicas ocorrem em relação ao tempo de armazenamento de um determinado alimento, pois permitem que ao longo do período, fatores abióticos (umidade e temperatura) e bióticos (insetos e fungos) ocorram (SILVA *et al.*, 2001).

O processamento e armazenamento dos alimentos podem influenciar em sua qualidade, fazendo com que, após um determinado tempo, os produtos apresentem uma condição insatisfatória para o consumo. Estudos químicos e microbiológicos são realizados para estimar o tempo de vida do produto,

impedindo que sejam consumidos indevidamente. Contudo, quando o consumidor adquire um alimento, ele o avalia por suas características sensoriais, como odor, sabor, aparência e textura. Caso alguns destes aspectos não agradem, este poderá ser levado a optar por outra marca em sua próxima compra do mesmo produto. Desta forma, além de estudos químicos e microbiológicos, as empresas também conduzem estudos baseados em avaliações sensoriais a fim de estimar o tempo de vida de prateleira (*shelf-life*) dos produtos alimentícios (KELLES, 2007).

A utilização de compostos produzidos pelas plantas vem se mostrando uma forma de tratamento com potencial no controle de doenças pós- colheita. Alguns estudos tem apontado para a possibilidade de aplicação de óleos de plantas no controle de doenças causadas por microorganismos patogênicos em plantas (SIQUEIRA JUNIOR *et al.*, 2011)

Gonçalves (2003) publicaram um estudo sobre as sementes tratadas com cravo da Índia a 10%, onde não foi verificado o desenvolvimento de *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp* e *Macrophomina phaseolina*, porém este produto, nesta concentração, reduziu o índice de velocidade de germinação, além de ter reduzido a ocorrência de fungos durante o armazenamento.

Diversas perdas em pós-colheita de frutas e sementes estão relacionadas a contaminação fúngica (MARCHEZAN, 2009). Uma das doenças mais importantes do maracujazeiro amarelo, do mamoeiro (TAVARES; SOUZA, 2005), da goiaba (FERRAZ, 2010), no morango (DIAS-ARIEIRA *et al.*, 2010), na cultura da atemóia (TAKAHASHI, 2008) na pós-colheita é a antracnose, causando manchas ou podridões na superfície dos frutos, podendo afetar folhas e ramos em todas as fases da planta, deixando o fruto impróprio para a comercialização, e o principal agente etiológico é o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (ALMEIDA; COELHO, 2007; FUGA *et al.*, 2011). Este fungo também causa manchas manteigosas em cafeeiros, segundo Silva *et al.*, (2008). Milanesi *et al.*, (2009) relatam infecção em folhas de pupunheira, causando queda prematura de frutos, em folhas de álamo, em eucaliptos, no araçá, goiaba serrana e em folhas de jambeiro. É a doença mais importante da cebolicultura (HADDAD *et al.*, 2003), em plantações de abobrinhas (TEIXEIRA

et al., 2004), em mangueiras, jaqueiras, pés de seriguela e umbu (MARTINS *et al.*, 2005)

Os fungos fitopatogênicos são assim chamados por causarem doenças nas plantas, no Brasil vem se destacando o fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae* por estar associado a mais de 500 espécies de plantas, sendo considerado um dos agressores mais resistente da região tropical (NUNES, 2008).

Lopes *et al.*, (2009) objetivando conhecer o agente etiológico e o inseto vetor da morte-descendente-da-mangueira comprovaram ser o fungo *Lasiodiplodia theobromae* o agente causador da murcha, seca e desfolha progressiva dos ramos em direção ao caule, chegando a atingir o tronco da planta e provocando sua morte. Fungo responsável pela “podridão-seca”, podendo atacar as mangueiras (MARQUES, 2010), videiras (RODRIGUES, 2003), o mamão (PEREIRA, 2009), em coqueiros (HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2005), em goiabeiras (CARDOSO *et al.*, 2005), além de já ter sido relatado em cajueiro, cacauzeiro, guaranazeiro, mamoneira, gravioleira e ateira (RIBEIRO *et al.*, 2006)

Na procura de outros métodos de controle, que não os fungicidas convencionais, comercializados atualmente, em função de sua fitotoxicidade e pela busca de produtos orgânicos, as pesquisas com uso de extratos vegetais tornam-se fundamentais um vez que seus metabólitos secundários podem ter efeito inibidor sobre a ação ou desenvolvimento de diversos fungos (MARCHEZAN, 2009).

Ainda nesta atual tendência dos órgãos reguladores da produção alimentícia de retirar progressivamente os aditivos químicos na produção dos alimentos e sem deixar de citar, novamente, o consumidor mais exigente, continua a grande busca da indústria por compostos alternativos que possam fornecer uma estabilidade microbiana dos seus produtos finais inibindo ou diminuindo a ação de microrganismos causadores de deterioração e/ou de doenças (CRUZ; PEREIRA, 2010)

Bedin (1999) já relatava a importância da conservação de alimentos utilizando o sistema antimicrobiano natural e ao longo dos anos, tem-se

observado que os condimentos, além de conferirem sabor aos alimentos, também podem possuir esta atividade.

Compostos antimicrobianos são encontrados nas folhas, flores, bulbos e frutos de plantas, ervas e especiarias, bem como em seus óleos e compostos isolados, inibindo atividades metabólicas de bactérias, leveduras e mofo (MARTINS, 2011).

Um dos microrganismos mais importantes na área de alimentos é a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus* e sua principal via de transmissão é o manipulador de alimentos, que pode ser portador da bactéria, provocando um quadro de intoxicação alimentar nos indivíduos que ingeriram o alimento por ele contaminado (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Os estafilococos são células gram-positivas que geralmente se dispõem em agrupamentos irregulares semelhantes a “cachos de uva”, são anaeróbios facultativos, imóveis e não formam esporos. Crescem rapidamente na maioria dos meios bacteriológicos em condições aeróbicas a 37 C, fermentando carboidratos. Em geral, formam colônias acinzentadas e amarelo-dourado intenso (JAWETZ *et al.*, 2000).

Quase todos os indivíduos apresentam algum tipo de infecção por *S. aureus* durante a sua vida, pois este patógeno pode provocar desde uma simples infecção, como espinhas e furúnculos, até graves enfermidades, potencialmente fatais. O estado de portador nasal deste microorganismo é observado em 40 a 50% dos seres humanos (MARTINS, 2011; JAWETZ *et al.* 2000).

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são um grande problema de saúde pública no mundo. No Brasil de 1999 a 2010 foram notificados 6.971 surtos por DTA, acometendo mais de 33.000 pessoas e 80 óbitos (BRASIL, 2011).

Márquez *et al.*, (2003) realizaram uma revisão em 60 artigos que reportam estudos citando 159 plantas com atividade antimicrobiana frente a 39 espécies de microrganismos, de 1976 a 2003. A classe de metabólitos secundários presentes nas espécies foram compostos fenólicos (ácidos

fenólicos, fenóis simples, flavonas, taninos e cumarinas), terpenos, alcalóides polipeptídeos e poliactílenos.

Trabalhos desenvolvidos com extratos obtidos a partir de plantas medicinais da flora nativa têm indicado o potencial das mesmas no controle de alguns fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos com características elicitoras. A determinação da atividade biológica dessas moléculas, com respeito à atividade elicitora ou antimicrobiana, poderão contribuir para a aquisição de maiores conhecimentos que reforcem sua possível utilização como um método alternativo de controle de doença de plantas (CARVALHO, 2010).

Substâncias oriundas de plantas são, ainda hoje, de grande valor social e econômico no que diz respeito à obtenção de fitoterápicos para o tratamento de inúmeras enfermidades. Em todo o mundo ainda utilizam plantas medicinais em receitas caseiras e, considerando-se esse fato, torna-se cada vez mais necessário o conhecimento do potencial de atividade biológica das substâncias isoladas de plantas (SANTOS, 2005).

Na natureza, a maioria das plantas é resistente aos diferentes patógenos com os quais convivem e essa resistência pode estar relacionada à existência de substâncias antimicrobianas naturalmente produzidas. Portanto, espera-se que a descoberta de metabólitos naturais sintetizados pelas diversas plantas que compõem a flora nativa e que apresentam efeito antimicrobiano, possa contribuir para o controle das doenças das plantas. A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes no extrato bruto ou suas frações pode se constituir, ao lado da indução de resistência, em mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças em plantas cultivadas (CARVALHO, 2010).

Um grande número de plantas apresenta propriedades antimicrobiana em seus extratos e tem despertado grande interesse para o controle de doenças por representarem uma fonte importante com potencial ação fungicida e bactericida. Entretanto, essas propriedades são dependentes de uma série de fatores inerentes às plantas, como órgãos utilizados, idade e estágio vegetativo, bem como a espécie da planta e do fitopatógeno envolvido, o tipo de doença a ser controlada e os processos tecnológicos utilizados na obtenção

e manipulação do extrato, além das ações externas de tempo, temperatura, umidade, sazonalidade, localização geográfica e a necessidade ou não de produzir os metabólitos secundários.

Diversas moléculas complexas como terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos são sintetizados pelo chamado metabolismo secundário das plantas e são de grande importância nas relações ecológicas planta/planta, planta/animal e, inclusive, planta/microrganismo fitopatogênico. A descoberta de novas substâncias antimicrobianas chama a atenção e acredita-se que possam ser utilizadas diretamente pelo produtor, por meio do cultivo da planta “fungicida”, seu preparo e, ainda, aplicação direta do extrato na planta cultivada e em produtos pós-colheita. Outra possibilidade é a identificação de substância(s) com característica bactericida nos extratos vegetais, as quais serviriam de modelo para a síntese química de defensivos agrícolas naturais. Diversos trabalhos mostram o potencial de plantas medicinais e seus subprodutos no controle de fitopatógenos, contudo, ainda são escassas pesquisas relacionadas ao uso desses produtos alternativos para o controle de doenças pós-colheita.

2.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOLPHO, L. de O.; STUCKER, C., DALCOL, I. I. Isolamento de metabólitos e análise da inibição enzimática de *Richardia brasiliensis* Gomes.]. In: XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul), 2008, Blumenau. **Resumos...**Blumenau: *SBQSul*, 2008.

ADEKUNLE, A. A. Antifungal Property of the Crude Extracts of *Brachystegia eurycoma* and *Richardia brasiliensis*. **Nig. J. Nat. Prod. and Med.**, v. 4, p. 70-72, 2000.

AGRA M. F.; FRANÇA P. F.; BARBOSA-FILHO J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 17: 114-140. 2007

ALMEIDA, A. P. **Atividade Antimicrobiana de Extratos e de Compostos Fenólicos e Nitrogenados do Café: Avaliação *In Vitro* e em Modelo Alimentar**. 2005. 137f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-UFMG, Faculdade de Farmacia, Belo Horizonte, MG, 2007.

ADEGAS, F. S.; OLIVEIRA, M. F.; VIEIRA, O. V.; PRETE, C. E. C.; GAZZIERO, D. L. P.; VOLL, E. Levantamento fitossociológico de plantas daninhas na cultura do girassol. **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 705-716, 2010.

ALMEIDA, L. C. C.; COELHO, R. S. B. Caracterização da Agressividade de Isolados de *Colletotrichum* de Maracujá Amarelo com Marcadores Bioquímico, Fisiológico e Molecular. **Fitopatol. Bras**, v. 32, n. 4, p. 1-11, 2007.

SILVA, T. S. S. **Estudo de Tratabilidade físico-química com o uso de taninos vegetais em água de abastecimento e esgoto**. Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; p.88.1999.

BEDIN, C.; GUTKOSKI, S. B.; WIEST, J. M. Atividade antimicrobiana das especiarias. **Higiene Alimentar**, v. 13, n.65, p. 26-29, 1999.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Primeiro relatório nacional para a convenção sobre diversidade biológica**. Brasília: MMA, 1998. 283 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Serviço de Vigilância Sanitária (SVS). Doenças Transmitidas por Alimentos: informações técnicas. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>. Acesso em 15/07/2012.

CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M.; TESSARI, E. N .C.; BALDASSI, L.; PINHEIRO, E. S. Pesquisa de Salmonella spp, coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. **Higiene Alimentar**, v.19, n.128, p.144-150, 2005.

CARVALHO, P. R. S. **Extratos vegetais: potencial elicitador de fitoalexinas e atividade antifúngica em antracnose do cajueiro**. Tese (Doutorado em Agranomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, 2010.

CHIQUIERI, A.; MAIO, F. R. DI; PEIXOTO, A. A distribuição geográfica da família *Rubiaceae* Juss. na Flora Brasiliensis de Martius. **Rodriguésia**, v. 55, n. 84, p. 47-57, 2004.

CORREA, I.; CORREA, M.G.P.; MARIN, J.M. Antimicrobial susceptibility of strains of coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from mastitic bovine milk. **ARS Vet.**, v.21, p.69-76, 2005.

CRUZ, P. B. da; PEREIRA, C. A. M. Avaliação da presença de antimicrobianos naturais em condimentos industrializados. **Rev. Simbio-Logias**, v. 30, n. 5, p. 125-131, 2010.

DIAS-ARIEIRA, C. R.; FERREIRA, L. R.; ARIEIRA, J. O.; GONÇALVES MIGUEL, E.; DONEGA, M. A.; RIBEIRO, R. C. F. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. **Summa Phytopathol**, v. 36, n. 3, p. 228-232, 2010.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **MultiCiência**, v. 1, n. 7, p. 1-16, 2006.

D'APOLITO, C.; PESSOA, S. M.; BALESTIERI, F. C. L. M.; BALESTIERI, J. B. P. Pollen harvest by *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) in the Dourados region, Mato Grosso do Sul state (Brazil). **Acta bot. bras.**, v.24, n.4, p. 898-904. 2010.

EDEOGA, H. O.; OKWU, D. E.; MBAEBIE, B. O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 685-688, 2005.

FERRAZ, D. M. M. **Controle da Antracnose (*colletotrichum gloeosporioides*) em pós-colheita da goiaba (*Psidium guajava*), produzida em sistema de cultivo convencional e orgânico, pela aplicação de fosfitos, hidrotermia e cloreto de calcio**. 2010. 119 f. Dissertação (Mestre em Fitopatologia)-Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, Brasília, DF, 2010.

FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; SOARES, M. L.; PIMENTA, F. C.; BARA, M. T. F.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. Avaliação da atividade antimicrobiana das partes aéreas (folhas e caules) e raízes de *Richardia brasiliensis* Gomez (Rubiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 65-68, 2009.

FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; SOARES, M. L.; BARA, M. T. F.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. Determinação de Parâmetros para Controle de Qualidade da *Richardia brasiliensis* (Rubiaceae). **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 29, n. 2, p. 192-197, 2010.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2003.

FUGA, C. A. G.; GONÇALVES, D. C.; CUNHA, W. V. da. Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* por *Bacillus spp.* "in vitro". **PERQUIRERE**, v. 8, n. 1, p. 188-194, 2011.

GOMES C. B.; COUTO M. E.; CARNEIRO R. M. D. G. Registro de Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em Goiabeira (*Psidium guajava* L.) e Fumo (*Nicotiana tabacum* L.) no Sul do Brasil. **Nematologia Brasileira** 32:244-247. 2008.

GONÇALVES, E. P. Tratamento químico e natural sobre a qualidade fisiológica e sanitária em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenadas. **Rev. biociênc.**, v. 9, n. 1, p. 23-29, 2003.

GRANDI, T. S. M.; TRINDADE, J. A.; PINTO, M. J. F.; FERREIRA, L. L.; CATELLA, A. C. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 3, n. 2, p. 185-221, supl. 1989.

GUGLIERI-CAPORAL, A.; CAPORAL, F. J. M.; KUFNER, D. C. L.; ALVES, F. M. Flora invasora de cultivos de aveia-preta, milho e sorgo em região de cerrado do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Bragantia**, v. 70, n. 2, p.247-254, 2011.

HADDAD, F.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Avaliação de fungicidas para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em cebola. **Fitopatol. Bras.**, v. 28, n. 4, p. 435-437, 2003.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. de L. Queda de frutos em coqueiro causada por *Lasiodiplodia theobromae* em Roraima. **Fitopatol. Bras**, v. 30, n. 2, p. 203-203, 2005.

JAKIEMIU, E. A. R. **UMA CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO DE TOMILHO (*Thymus vulgaris* L.)**. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2008

JAWETZ, E. **Microbiologia Médica**, 21. Ed.d. Tradução Geo F. Brooks, Janet S. Butel, L. Nicholas Ornston, Joseph I. Melnick, Edward A. Adelberg. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

KABEYA, L. M.; AZOLLINI, A. E. C. S.; SORIANI, F. M.; VALIM, Y. M. L. **Estudo da atividade de cumarina no metabolismo oxidativo de neutrófilos**. Disponível em: <http://www.sbgq.org.br/ranteriores/23/resumos/1150-2/>. Acesso em: 06/07/2012

KELLES, F. F. **Tempo de Vida de Prateleira de Produtos Alimentícios Levando em Conta Erros de Avaliação**. 2007. 317 f. Dissertação (Mestrado em Estatística)-UFMG, Departamento de Estatística, Belo Horizonte, MG, 2007.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas: plantas dicotiledôneas, por ordem alfabética de famílias de *Geraniaceae* a *Verbenaceae***. 2. ed. São Paulo: BASF, 2000. v.3. 722 p.

LIMA, G. S.; MOURA, F. S.; LEMOS, R. P.; CONSERVA, L. M. Triterpenos de *Guettarda grazielae* M R.V. Barbosa (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1b, p. 284-289, 2009.

LOPES, E. B.; BRITO, C. H. de; ARAÚJO, L. H. A.; NASCIMENTO, L. C. do; BATISTA, J. de L. Etiologia e inseto vetor da morte-descendente-da-mangueira (*Mangifera indica*) no Estado da Paraíba. **Tecnol. & Ciên. Agropec**, v. 32, n. 1, p. 37-40, 2009.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 608 p.

MARCHEZAN, A. **Contribuição para o estudo químico de *Turnera ulmifolia* (turneraceae) e atividade antifúngica e antioxidante**. 2009. 10 p. Pesquisa Científica (Mestrado em Produção e Gestão Agraindustrial)-Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande, MS, 2009.

MARQUES, M. W. Compatibilidade vegetativa de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* associadas à cultura da mangueira. In: X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2010, 2010, Recife. **Anais...Recife: JEPEX**, 2010. p. 1-3.

MARTINS, I.; MELLO, S. C. M. de; ÁVILA, Z. R. de; PADUA, R. R.; PEIXOTO, J. R. **Produção de *Colletotrichum gloeosporioides* em Meios Líquidos**. 45. ed. Brasília, DF: EMBRAPA, 2005. 6 p.

MARTINS, J. G. P. **Atividade Antimicrobiana de Produtos Naturais: erva mate e resíduos agroindustriais**. 2011. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciência)-Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2011.

MILANESI, P. M.; BLUME, E.; MUNIZ, M. F. B.; BRAND, S. C.; JUNGES, E.; MANZONI, C. G.; WEBER, M. N. D. Ação fungitóxica de extratos vegetais sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista da FZVA**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2009.

MILANEZE, M.; MELLO, E.; PEREIRA, K.; SALLES, N.; SILVA, K.; MACEDO, C.; DOURADO, D. M.; MATIAS, R. Estudo químico das folhas de poaia-branca (*Richardia brasiliensis*). I ENCONTRO NACIONAL DE

INOVAÇÃO CIENTÍFICA PARA O HOMEM DO SÉCULO XXI, IV ENCONTRO DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIDERP, 2005, Campo Grande-MS. **Anais...**Campo Grande-MS: Editora da UNIDERP, 2005. v. 1. p. 211-213.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade brasileira**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 19 abr. 2012.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Dinâmica do banco de sementes em áreas com aplicação freqüente do herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 21, p.63-69, 2003

MONQUERO, P. A.; CURY, J. C.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Controle pelo glyphosate e caracterização geral da superfície foliar de *Commelina benghalensis*, *Ipomoea hederifolia*, *Richardia brasiliensis* e *Galinsoga parviflora*. **Planta Daninha**, v.23, p.123-132, 2005.

NASCIMENTO, S. C. Antimicrobial and cytotoxic activities in plants from Pernambuco, Brazil. **Fitoterapia**, v.61, p.353-355, 1990.

NUNES, F. M. **Estudo Químico do Fungo Fitopatogênico *Lasiodiplodia theobromae* (Sphaeropsidaceae)**. 2008. 212 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica)-Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, CE, 2008

OLIVEIRA, C. M. de. **Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos associados com a espécie vegetal *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. 2009. 291 f. Tese (Doutorado em Química)-Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2009.

OLIVEIRA, É. L. A.; LEMOS, W. de P.; ARAUJO, S. C. A. In: 7º Seminário de Iniciação Científica da UFRA e 13º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA, 2009, Manaus, AM. **Ocorrência de *richardiidae* (diptera) em frutos de inajá *maximiliana maripa* (aublet) drude coletados em feiras livres de Belém**. Anais do 7º Seminário de Iniciação Científica da UFRA e 13º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA, 2009. p. 1-4. v. 1.

OLIVEIRA, P. R. N. Triterpenos isolados de *Guettarda pohliana* (Rubiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 305-318, jan. 2004.

OLIVEIRA, P. L. de. **Contribuição ao Estudo da Espécie da Família Rubiaceae: Fitoquímica da Espécie *Amaioua Guianensis* Aubl.** 2009. 111 f. Tese (Mestrado em Química)-Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, Goiania, 2009.

PEDRINHO JÚNIOR, A. F. F.; BIANCO, S.; PITELLI, R. A. Acúmulo de massa seca e macronutrientes por plantas de *Glycine max* e *Richardia brasiliensis*. **Planta Daninha**, v.22, n.1, p.53-61, 2004.

PEREIRA, A. V. da S. **Sensibilidade a Fungicidas e Adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobromae* Patogênico ao Mamão.** 2009.58 f. Dissertação (Mestre em Fitopatologia)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2009.

PEREIRA, M. do S.; BARBOSA, M. R. de V. A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamílias *Antirheoideae*, *Cinchonoideae* e *Ixoroideae*. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 305-318, 2004.

PINTO, D. S.; TOMÁZ, A. C. A.; TAVARES, J. F.; TENÓRIO-SOUZA, F. H.; DIAS, C. da S.; BRAZ-FILHO, R.; DA-CUNHA, E. V. L. Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 367-372, 2008.

RIBEIRO, V. Q.; SILVA, G. S.; PEREIRA, A. L. Caracterização Fisiológica, Cultural e Patogênica de Diferentes Isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatol. Bras**, v. 31, n. 6, p. 203-203, 2006.

RIBEIRO, V. V. **Efeitos de fungicida e produtos naturais sobre o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em sementes de caupi.** 2008. 90 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia, 2008.

ROBBERS, J. E; SPEEIE M. K.; TYLER V. Ê. **Farmacognosia Biotecnológica.** São Paulo: Editorial Premier, 1997.

RODRIGUES, R. **Caracterização morfológica e patológica de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., agente causal das podridões de**

tronco e raízes da videira. 2003. 68 p. Dissertação (Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical)-Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP, 2003.

ROSSETO, R. R.; PITELLI, R. L. C. M.; PITELLI, R. A. Estimativa da área foliar de plantas daninhas: poaia-branca. **Planta daninha**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 1997.

SANTOS, B. R. Aspectos fitoquímicos de tecidos foliares de SALIX. **Magistra**, v. 20, n. 1, p. 1-5, 2008.

SANTOS, L. de Á. **Estudo químico e das atividades citotóxica, antioxidante e antifúngica de Prunus myrtifolia L. (Urban.) (ROSACEAE).** 2005. 198p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista. Araraquara, SP, 2005.

SILVA, P, M. da; GULARTE, M., A.; CAVALHEIRO, F. Z. A. In: XVI Congresso de Iniciação Científica, 2001, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. **Anais...:** 2001.p. 1-4.

SILVA, V. C. da. **Estudo químico e biológico de espécies de Rubiaceae.** 2007. 332 f. Tese (Doutorado em Química)-Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2007.

SIMÕES C. M. O.; SCHENKEL E. P.; GOSMANN G.; MELLO J. C. P.; MENTZ L. A.; PETROVICK P. R. 1999. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: Editora UFRS/UFSC, 1999.

SIQUEIRA JÚNIOR, C. L.; MORAES, T. C.; MARTINS, J. A. B.; FREIRE, M. G. M. Controle da antracnose em mamão por extratos vegetais. **Perspectivas on-line**, v.1, n.1, 2011.

TAKAHASHI, L. M. **Identificação de Colletotrichum gloeosporioides de atemóia (Annona cherimola x Annona squamosa), por meio de caracterização patogênica, cultural e morfológica.** 2008. 52 f. Dissertação (Mestre em Agronomia)-Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, SP, 2008.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. de. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciênc. agrotec**, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2005.

TEIXEIRA, M. A. T.; BETTIOL, W.; CESNIK, R.; VIEIRA, R. Faria. Patogenicidade do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, patógeno da cochonilha *Orthezia praelonga*, a diversos frutos e a plântulas de abobrinha. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 26, n. 2, p. 356-358, 2004.

TENÓRIO-SOUZA, F. H. Nova cumarina isolada de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). 32^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA - SBQ, **Anais...**28 a 31 de maio de 2011. Águas de Lindóia: SBQ. 2011.

3.CAPITULO II

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DO EXTRATO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE *Richardia brasiliensis* GOMES

Fernanda Sollberger Canale¹; Rosemary Matias^{1:2}

¹Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional - Universidade Anhanguera-Uniderp. Rua Alexandre Herculano, 1.400, CEP 79.037-280, Campo Grande, Brasil.

²Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade Anhanguera-Uniderp. Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP). Rua nove, n°. 305, CEP 78.068-410, Cuiabá, Brasil.

RESUMO - A *Richardia brasiliensis* apesar de ser uma espécie apontada como invasora de pastagem e de lavoura em MS, é pouco estudada quanto a atividade biológica e substâncias presentes. O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade antibacteriana e antioxidante do extrato e frações (hexano, acetato de etila e hidrometanólica) de suas partes aéreas (folhas e caules). O EX_{EtOH} e as frações foram submetidas a análise fitoquímica via úmida, por meio de reações de precipitação e/ou mudança de cor. Foram determinados: compostos fenólicos (Método: Folin-Ciocalteu's), flavonóides totais (Método: $AlCl_3$) e atividade antioxidante (Método: DPPH). A atividade antibacteriana foi avaliada pelos métodos de difusão em ágar e susceptibilidade em microdiluição em caldo. Os resultados fitoquímicos indicaram a presença de compostos fenólicos; taninos; flavonóides; cumarinas; triterpenos; esteróides; alcalóides e saponinas para o EX_{EtOH} . Para as frações F_{Hex} (flavonóides; cumarinas; triterpenos; esteróides); F_{Acet} (compostos fenólicos; flavonóides; cumarinas; triterpenos; esteróides; alcalóides) e $F_{H/MeOH}$ (compostos fenólicos; taninos; flavonóides; cumarinas; saponinas) ocorreu diferença na classe de metabólitos secundários presentes. O conteúdo de

compostos fenólicos e flavonóides totais foi maior para a fração F_{Acoet} (C.F.= $798,50 \pm 0,6 \mu\text{g/g}$ e F. T.= $253,42 \pm 0,9 \mu\text{g/g}$), seguido do EX_{EtOH} (C.F.= $685,35 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$ e F.T.= $195,70 \pm 1,9 \mu\text{g/g}$) e das frações $F_{\text{H/MeOH}}$ (C.F.= $347,55 \pm 1,2 \mu\text{g/g}$ e F.T.= $23,06 \pm 1,0 \mu\text{g/g}$) e F_{Hex} (C.F.= $124,00 \pm 1,1 \mu\text{g/g}$ e F.T.= $63,10 \pm 0,9 \mu\text{g/g}$). A fração F_{Acoet} e a F_{Hex} apresentaram maior atividade antioxidante. O extrato EX_{EtOH} ($14,5 \pm 0,5 \text{ mm}$) e a fração F_{Hex} ($15,3 \pm 1,1 \text{ mm}$) apresentaram halo de inibição moderada frente ao *S. aureus* nas concentrações mais baixas, sendo inativo nas maiores concentrações e inativo para *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* em todas as concentrações testadas. Apenas a fração F_{Hex} (CMI de $6,25 \text{ mg/mL}$) e a fração F_{Acoet} ($12,5 \text{ mg/mL}$) apresentaram atividade frente *S. aureus*.

Palavras-chave: Euphorbiaceae; *Staphylococcus aureus*; DPPH; compostos fenólicos.

ABSTRACT - The *Richardia brasiliensis* despite being identified as a species invading pasture and crop in MS, is little studied biological activities and substances. The objective of this study was to determine the antioxidant and antibacterial activity of the extract and fractions (hexane, ethyl acetate and hydromethanol) of its aerial parts (leaves and stems). The EX_{EtOH} and the fractions were subjected to phytochemical analysis wet through precipitation reactions and / or change in color. Were determined phenolic compounds (Method: Folin-Ciocalteu's), total flavonoids (Method: AlCl_3) and antioxidant activity (Method: DPPH). The antibacterial activity was evaluated by agar diffusion method and microdilution in susceptibility. The results indicated the presence of phytochemicals phenolic compounds, tannins, flavonoids, coumarins, triterpenes, steroids, alkaloids, saponins for EX_{EtOH} . For fractions F_{Hex} (flavonoids, coumarins, triterpenes, steroids); F_{Acoet} (phenolics, flavonoids, coumarins, triterpenes, steroids, alkaloids) and $F_{\text{H/MeOH}}$ (phenolic compounds, tannins, flavonoids, coumarins, saponins) difference occurred in class secondary metabolites present. The content of phenolic compounds and flavonoids was higher for F_{Acoet} fraction (CF = $798.50 \pm 0.6 \text{ mg/g}$ FT = $253.42 \pm 0.9 \text{ mg/g}$), followed by EX_{EtOH} (CF = $685.35 \pm 0.4 \text{ mg/g}$ FT = $195.70 \pm 1.9 \text{ mg/g}$) and fractions $F_{\text{H/MeOH}}$ (CF = $347.55 \pm 1.2 \text{ mg/g}$ FT = $23.06 \pm 1.0 \text{ mg/g}$) and F_{Hex}

(CF = 124.00 ± 1.1 mg/g FT = 63.10 ± 0.9 mg/g). The fraction F_{Acet} and F_{Hex} showed higher antioxidant activity. Ex_{EtOH} extract (14.5 ± 0.5 mm) and F_{Hex} fraction (15.3 ± 1.1 mm) showed moderate inhibition zone against *S. aureus* in lower concentrations, the highest concentrations being idle and inactive for *E. coli*, *P. aeruginosa* and *E. faecalis* at all concentrations tested. Only a fraction F_{Hex} (CMI of 6.25 mg/mL) and F_{Acet} fraction (12.5 mg/mL) showed activity against *S. aureus*.

Keywords: Euphorbiaceae; *Staphylococcus aureus*; DPPH; phenolic compounds

1 INTRODUÇÃO

O gênero Rubiaceae é composto com cerca 15 espécies, distribuídos principalmente no Norte da América do Sul (LEWIS; OLIVER, 1974) e na Africa (EDEOGA *et al.*, 2005). Espécies deste gênero são relatadas como plantas daninhas (MONQUERO; CHRISTOFFOLETI, 2003; PEDRINHO JUNIOR *et al.*, 2004; MONQUERO *et al.*, 2005) e reconhecê-las é importante, a fim de beneficiários de planejamento agrícola.

A *Richardia brasiliensis* Gomes, conhecida como falsa poaia, é uma planta nativa da América do Sul. Ocorre desde a região dos Andes, onde pode ser encontrada até a 2500 m de altitude, até a costa oriental, junto ao oceano Atlântico. É uma espécie cosmopolita, infestante de pastagens (KISSMANN; GROTH, 2000), na África, em especial na Nigéria, é utilizada na medicina popular no tratamento de eczema e malária (EDEOGA *et al.*, 2005).

No Brasil a *R. brasiliensis* tem vasta distribuição, mas é mais notada em áreas agrícolas do Centro-Oeste, Sudeste e Sul, sendo caracterizada como planta daninha ocupando áreas de pastagens, áreas desocupadas, jardins e de lavouras nas quais oferece competição especialmente no início do ciclo de culturas anuais de verão. Tolerava certo grau de sombreamento, causando problema até na operação de colheita, devido à sua grande massa vegetativa

cobrindo completamente o solo, à semelhança de um tapete (LORENZI, 2000; KISSMANN; GROTH, 2000).

No que se refere às suas características terapêuticas é citada na medicina popular como emética e no tratamento de diabetes (PINTO *et al.*, 2008). Com relação aos ensaios antimicrobianos Correa *et al.* (2005) avaliaram apenas o extrato etanólico de *R. brasiliensis* da região de Goiás frente as Cepas *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphilococcus aureus* (ATCC 29737), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), sendo que destas bactérias apenas a *S. aureus* apresentou resultado positivo.

Entre os agentes mais comuns de infecções patogênicas está o *Staphilococcus aureus* (VOLK *et al.*, 1996). São bactérias, cocos Gram-positivos, que fazem parte da microbiota normal da pele e mucosa de mamíferos e aves, e estão amplamente distribuídos na natureza. Estas infecções podem se localizar na pele ou em regiões mais profundas. Quando na pele pode causar uma resposta inflamatória intensa podendo causar foliculite, furunculose, impetigo, carbúnculo ou abscessos subcutâneos (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Os fármacos usados no tratamento das doenças infecciosas são antibióticos, análogos ou quimioterápicos (FONSECA, 1999). Porém, este tipo de tratamento, em muitos casos, leva à resistência de microorganismos e uma das alternativas é a busca de substâncias de origem vegetal que possam ser mais eficazes, assim estudos com plantas com potencial antibacteriano possuem grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, principal para as espécies que possuem elevadas concentrações de compostos fenólicos livres, flavonóides e conseqüentemente elevada atividade antioxidante, características estas importantes para atividade antimicrobiana (BARREIROS; DAVID, 2006).

Considerando a escassez de informações de estudos farmacológicos de *R. brasiliensis* e que a região possa influenciar na presença de metabólitos secundários e conseqüentemente na ação das espécies vegetais, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antibacteriano e antioxidante do extrato e frações desta espécie assim como determinar os compostos fenólicos e flavonóides.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do material vegetal e extratos: As partes aéreas (folhas e caules) de *Richardia brasiliensis* foram coletadas próximas a Horta de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Anhaguera–Uniderp, Campo Grande-MS, (20°26'20.64"S; 54°32'26.78"O) e uma exsicata do exemplar encontra-se depositada no Herbário desta instituição sob o número de registro 05052.

O material botânico foi limpo, seco em estufa de ventilação de ar à 45 °C (MARCON[®], MA35), por 3 dias, pesados, pulverizadas em moinho elétrico (MARCONI[®], MA048) e tamisado (malha n° 60). Do material processado, 760,5 g foram submetidas a extração com etanol (99,5 %). A extração ocorreu em banho de ultra-som por 60 minutos (UNIQUE[®], 1450) seguido por maceração, à temperatura ambiente, repetindo-se este procedimento até que não houvesse mais material a ser extraído, o que correspondeu a 15 dias. O solvente foi evaporado sob vácuo em evaporador rotativo (Tecnal[®], MA120), obtendo-se 19,8 g de extrato bruto etanólico (EX_{EtOH}).

Análise Fitoquímica: Para os ensaios de detecção dos diversos constituintes químicos 15,5 g do EX_{EtOH} foi dissolvido em metanol/água (1:1) e submetido à partição sucessivamente em hexano e acetato de etila. Após remoção dos solventes obteve-se as frações hexânica (F_{Hex} = 4,1 g), acetato de etila (F_{Acet} = 3,2 g) e a fração hidrometanólica (F_{H/MeOH} = 7,1 g). O EX_{EtOH} e as frações foram submetidas a análise fitoquímica via úmida, por meio de reações de precipitação e/ou mudança de cor, com base no método descrito por Matos (1997) e Costa (2002). As análises foram executadas em repetições e os resultados foram comparados e contrastados observando a alteração de cor e precipitação (COSTA, 2002).

A confirmação da classe de metabólitos secundários e o sistema de eluição foram realizados por meio de cromatografia de camada delgada (CCD: Sílica-gel 60F₂₅₄) empregando reagentes específicos para terpenos, alcalóides, compostos fenólicos e flavonóides (WAGNER; BLADT, 2009).

Determinação dos compostos fenólicos: O teor de fenólicos totais (FT) do EX_{EtOH} e das frações (F_{Hex} ; F_{Acoet} e $F_{H/MeOH}$), foi determinado pelo Método Folin-Ciocalteu's utilizando 100 mg de cada amostras. Os testes foram realizados utilizando-se um espectrofotômetro na região de 750 nm (FEMTO[®], 432), cubetas de quartzo, e como padrão o ácido gálico (10 a 300 $\mu\text{g/mL}$). Para as análises de FT foi utilizado um espectrofotômetro na região de 750 nm (FEMTO[®], 432), cubetas de quartzo, por interpolação da absorbância das amostras por meio da curva de calibração ($y = 0,0077 x - 0,0228$; $R^2 = 0,9985$) construída com padrões de ácido gálico (10 a 300 $\mu\text{g/mL}$) O delineamento experimental foi de três repetições para cada concentração e o cálculo das médias foi acompanhado do desvio padrão (SOUSA *et al.*, 2007).

Determinação dos flavonóides: Para quantificação dos flavonóides no extrato (100 mg) EX_{EtOH} e das frações (100 mg) F_{Hex} ; F_{Acoet} e $F_{H/MeOH}$ utilizou-se método adaptado por Peixoto Sobrinho *et al.* (2008) e como padrão quercetina (0,5 mg/mL) para construir a curva de calibração nas concentrações de: 0,04; 0,2; 0,4; 2; 4; 8; 12; 16; 20 $\mu\text{g/mL}$ ($y = 0,0637 x - 0,0067$ $R^2 = 0,9991$). As análises foram realizadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 420 nm, em cubetas de quartzo. O delineamento experimental foi de três repetições para cada concentração e o cálculo das médias foi acompanhado do desvio padrão.

Atividade Antioxidante: Os testes de atividade antioxidante foram realizados para o EX_{EtOH} e F_{Hex} ; F_{Acoet} e $F_{H/MeOH}$. Os potenciais de atividade antioxidante foram determinados com base na atividade sequestradora de radical livre do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). As amostras nas concentrações de 250, 200, 150, 100, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$ foram adicionadas à 2 mL de uma solução de DPPH em metanol (24 mg.100mL⁻¹ de metanol). Após 30 min a absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV-VIS, a 515 nm. A solução de DPPH em metanol foi utilizada como controle negativo e tendo como controle positivo o BHT (butilhidroxitolueno) nas mesmas concentrações usadas nas amostras (THAIPONG *et al.*, 2006). A porcentagem de inibição (% I) foi calculada pela

fórmula: $\% I = (A_0 - A) / A_0 \times 100$, em que A_0 é a absorvância do DPPH (controle) e A é a absorvância da amostra mais DPPH (SOUSA *et al.*, 2007).

Atividade Antibacteriana: O ensaio de avaliação da atividade antibacteriana foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Humana da Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande–MS, aplicando-se o teste de susceptibilidade para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI), concentração bactericida e a atividade antibacteriana (teste de difusão em ágar) (NCCLS, 2003). Os micro-organismos utilizados para os ensaios foram as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Padronização da suspensão bacteriana: Para cada amostra bacteriana foi preparada uma suspensão padronizada a partir da cultura de 24 horas em ágar Müeller-Hinton (CMH) (DIFCO®), em tubo contendo solução salina estéril (NaCl – 0,85 %), a densidade foi ajustada por comparação ao tubo n° 0,5 da escala McFarland (suspensão de BaSO₄ que corresponde aproximadamente $1,5 \times 10^6$ UFC/mL) (NCCLS, 2003). Para tanto, foi utilizado um aparelho fotométrico (FEMTO®, 432) em absorvância de 625 nm.

Método de difusão em disco: O teste de difusão em ágar foi realizado utilizando discos de papel (Whatman) com 6 mm de diâmetro, impregnados com 10 µL das amostras (extratos e frações) previamente dissolvidas em 1ml de DMSO (SIGMA®). Os discos foram secos à temperatura ambiente em câmara de fluxo laminar (FANEM®, 002CB).

As suspensões bacterianas foram inoculadas em concentração de 1:1, 1:10 e 1:100 do $E_{X_{EtOH}}$ e F_{Hex} ; F_{Acoet} e $F_{H/MeOH}$ em placas contendo CMH (8.1.2.1) com o auxílio de um *swab* estéril. Após este procedimento, os discos previamente preparados foram transferidos para meios contendo os inóculos. As placas foram incubadas a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$, durante 24 horas. Após este período, as placas foram inspecionadas quanto à presença de halos de inibição (medidos em mm). Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

O delineamento experimental foi de três repetições para cada concentração, para o controle positivo (gentamicina – 10mg/disco) e controle

negativo (DMSO). Neste trabalho foram considerados ativos halos acima de 12mm.

As amostras foram diluídas em meio Mueller-Hinton, obtendo uma série de concentrações, na ordem de 25 mg para 49 $\mu\text{g/mL}$. A suspensão padronizada foi diluída 1:100 no mesmo meio. Alíquotas de 5 μL da suspensão de bactérias foram adicionadas a cada poço da placa de microdiluição contendo 100 μL das diluições decimais da amostra. O mesmo procedimento foi desenvolvido com o controle negativo (DMSO) e com o controle positivo (Gentamicina). As placas foram incubadas à 37 °C por 24 horas.

A leitura para determinação do CMI foi definida como a maior diluição onde ocorreu inibição do crescimento, ou seja, ausência de turvação, quando comparado com o controle bacteriano.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise fitoquímica do extrato bruto etanólico (Ex_{EtOH}) das partes aéreas de *R. brasiliensis* e as frações obtidas do processo de partição (F_{Hex} , F_{AcOet} e $F_{\text{H/MeOH}}$) estão apresentados no quadro 1.

O Ex_{EtOH} apresentou oito classe de metabólitos secundários com predominância dos compostos fenólicos, flavonóides, triterpenos e esteróides. A F_{AcOet} em comparação as demais frações apresentou maior diversidade de compostos químicos (6 classes de metabólitos secundários) com destaque aos compostos fenólicos, flavonóides e triterpenos, seguido da $F_{\text{H/MeOH}}$ (5 classes de metabólitos secundários), sendo os compostos fenólicos e taninos com maior intensidade. Na F_{Hex} foram detectados 3 classes de metabólitos secundários com predominância dos triterpenos e esteróides.

Quadro 1: Resultado das análises fitoquímicas realizadas com o Ex_{EtOH} e com as frações (hexânica; acetato de etila e hidrometanólica) das partes aéreas (folhas e caule) de *R. brasiliensis*.

| Metabólitos Secundários | Extrato/Frações | | | |
|---------------------------|-----------------|------|--------|---------|
| | ExEtOH | FHex | FAcoet | FH/MeOH |
| Compostos Fenólicos | +++ | - | +++ | +++ |
| Taninos | ++ | - | - | +++ |
| Flavonóides | +++ | + | +++ | ++ |
| Cumarinas | ++ | - | ++ | ++ |
| Antocianinas | - | - | - | - |
| Antraquinonas | - | - | - | - |
| Triterpenos | +++ | ++ | +++ | - |
| Esteróides | +++ | +++ | ++ | - |
| Alcalóides | ++ | - | ++ | - |
| Glicosídeos Cianogênicos | - | - | - | - |
| Heterosídeos Cianogênicos | - | - | - | - |
| Saponinas | + | - | - | ++ |
| Açúcares redutores | - | - | - | - |

Extrato etanólico bruto= ExEtOH; Fração Hexânica= FHex; Fração acetato de etila= FAcoet; Fração hidrometanólica= FH/MeOH.

**Análise efetuada do extrato seco. + (menor intensidade) ++ (média intensidade) +++ (maior intensidade) (-) Negativo.

Na família Rubiaceae os constituintes mais comuns são os triterpenos e esteróides, os estudos fitoquímicos indicam divergência na classe de metabólitos secundários identificados nas partes aéreas de *R. brasiliensis*. Segundo Adekunle (2000), o extrato aquoso de *R. brasiliensis* contém tanino e

no extrato etanólico antraquinonas, flavonóides, saponinas e esteróides. Edeoga *et al.* (2005) avaliaram amostras procedentes da Nigéria e detectaram alcalóides, taninos, saponinas, esteróides, terpenos, flavonóides e glicosídeos cardiotônicos. Adolpho; Dalcol (2007) constataram a presença de alcalóides, triterpenoidais, esteroidais, compostos fenólicos e flavonóides e isolaram o β -sitosterol além do ácido ursólico. Pinto *et al.* (2008) isolaram e identificaram flavonóide (isorametina-3-Orutinosídeo), triterpeno (ácido oleanólico), cumarina (escopoletina) e ácidos fenólico (ácidos *p*-hidroxibenzóico e *m*-metoxi-*p*-hidroxibenzóico). Nas partes aéreas de *R. brasiliensis* foram identificados cumarinas, resinas, esteróides, triterpenóides, flavonóides e alcalóides (FIGUEREDO *et al.*, 2009; FIGUEREDO *et al.*, 2010).

O resultado da avaliação da atividade antioxidante (% AA) do Ex_{EtOH} e das frações (F_{Hex} , F_{Acoet} e $F_{H/MeOH}$) das partes aéreas (folhas e caule) de *R. brasiliensis* e do controle positivo BHT, determinada pelo ensaio de DPPH, nas diferentes concentrações (25-250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) está apresentado na Figura 1.

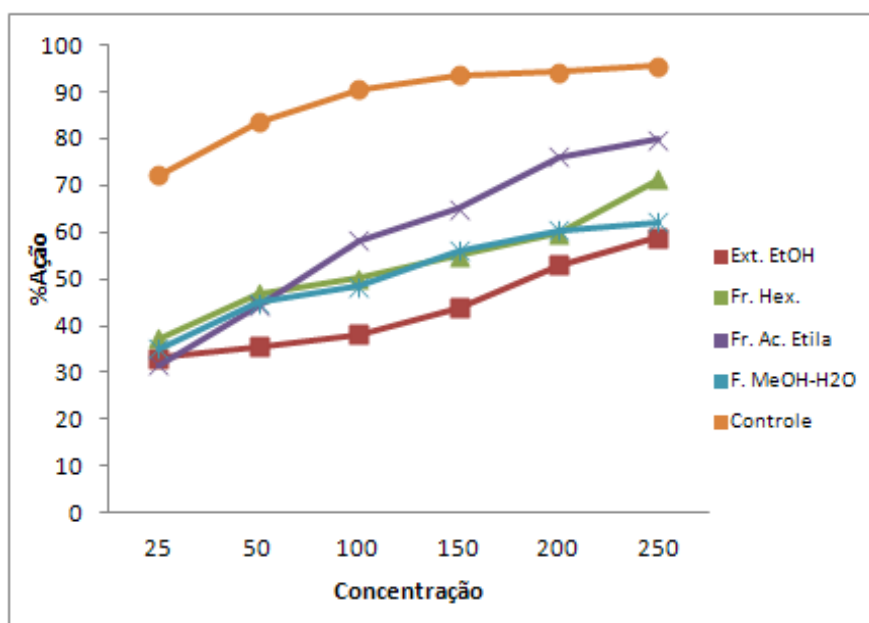


Figura 1: Porcentagem de atividade antioxidante do Ex_{EtOH} e das frações (F_{Hex} , F_{Acoet} e $F_{H/MeOH}$) das partes aéreas (folhas e caule) de *R. brasiliensis* e do BHT (butilhidroxitolueno) no tempo de 30 min.

Os resultados deste ensaio (Figura 1) mostraram que a fração F_{Acoet} seguido da fração F_{Hex} apresentaram maior potencial anti-radicalar quando comparados com o controle positivo BHT. Na fração F_{Acoet} estão presentes os compostos fenólicos, flavonóides, cumarinas, triterpenos, esteróides, alcalóides enquanto que na fração F_{Hex} os flavonóides, triterpenos e esteróides.

Comparando os resultados da atividade antioxidante com o teor de compostos fenólicos (Figura 2-gráfico 1) e flavonóides totais (Figura 2-gráfico 2) pode inferir que esta duas classes de metabólitos secundários possuem atividades sequestradoras de radicais, principalmente dos derivados fenólicos os quais vêm sendo amplamente discutida na literatura e está correlacionada a fatores mesoméricos que conferem a esse grupo funcional uma alta reatividade como doadores de elétrons (RICE-EVANS *et al.*, 1996; MUNOZ *et al.*, 2007).

Para a fração hexânica a atividade antioxidante pode estar ligada além dos flavonóides aos triterpenos pentacíclicos, especialmente para os triterpenos ácidos (LIU, 1995) isolados por Pinto *et al.* (2008) das partes aéreas de *R. brasiliensis*.

Os antioxidantes são compostos que combatem processos oxidativos diminuindo danos ao DNA e macromoléculas, atuam na diminuição ou inibição dos efeitos desencadeados por radicais livres (MAIA *et al.*, 2007). Quando apresentado aos substratos oxidativos nas concentrações ideais, eles inibem ou proporcionam um atraso significativo no processo oxidativo sendo este, divididos em enzimáticos, solúveis, nutricionais e sequestradores de metais de transição (VAYA; AVIRAM, 2001). A natureza dos antioxidantes vegetais é representada de maneira muito variada, devido à ampla capacidade antioxidativa os compostos fenólicos como taninos condensados, flavonóides, e xantonas são responsáveis por diminuir os efeitos nocivos dos radicais livres (RAZAVI *et al.*, 2008).

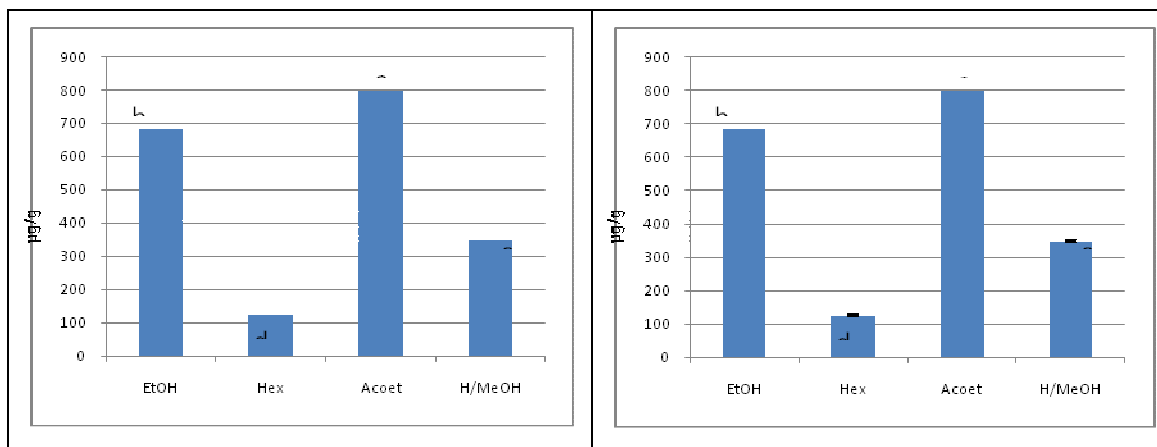


Figura 2: Gráficos 1 compostos fenólicos e Gráfico 2 flavonoides totais do EX_{EtOH} e das frações (F_{Hex} , F_{Acoet} e $F_{H/MeOH}$) das partes aéreas (folhas e caule) de *R. brasiliensis*.

A F_{Acoet} apresentou maior teor de compostos fenólicos ($798,5 \pm 0,6 \mu\text{g/g}$), seguido do EX_{EtOH} (C.F. = $685,35 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$) e das $F_{H/MeOH}$ (C.F. = $347,55 \pm 1,2 \mu\text{g/g}$) e F_{Hex} (C.F. = $124,00 \pm 1,1 \mu\text{g/g}$). Para os flavonóides totais. A F_{Acoet} (F. T. = $253,42 \pm 0,9 \mu\text{g/g}$) apresentou maior teor, seguido do EX_{EtOH} (F. T. = $195,70 \pm 1,9 \mu\text{g/g}$) e das frações F_{Hex} (F. T. = $63,10 \pm 0,9 \mu\text{g/g}$) e $F_{H/MeOH}$ (F. T. = $23,06 \pm 1,0 \mu\text{g/g}$).

Resultados semelhantes foram encontrados por Rosa *et al.* (2010) ao avaliarem o teor de compostos fenólicos para o extrato e frações polares de *Palicourea rígida*, uma Rubiaceae, a fração acetato de etila apresentou F.T. $933,25 \mu\text{g/ml}$, seguido do extrato etanólico ($469,8 \mu\text{g/ml}$) e fração metanólica ($159,4 \mu\text{g/ml}$).

Os compostos fenólicos e flavonóides totais foram detectados em duas espécies de *Richardia*, *Richardia grandiflora* Steud (TOMAZ *et al.*, 2008) e *Richardia brasiliensis* (ROSA *et al.*, 2010).

Atividade Antibacteriana

Os resultados das análises da atividade antibacteriana realizadas pelo método de difusão em ágar com do EX_{EtOH} e das frações (F_{Hex} , F_{Acoet} e $F_{H/MeOH}$) das partes aéreas (folhas e caule) de *R. brasiliensis* frente à *S. aureus*; *E. coli*; *P. aeruginosa* e *E. faecalis* estão apresentados na Tabela 1 com seus respectivos halos de inibição.

Neste estudo constatou-se que os halos de inibição de crescimento bacteriano variaram de 8,7 mm a 15,3 mm de diâmetro. Os extratos de plantas são considerados ativos quando os halos de inibição são superior a 12 mm de diâmetro (SILVA *et al.*, 2008) como ocorreu para o EX_{EtOH} de *R. brasiliensis* e para a F_{Hex} frente à cepa *S. aureus*.

Tabela 1: Medida dos halos de inibição (mm) obtidos no teste de difusão em ágar com o extrato etanólico (EX_{EtOH}) e das frações (F_{Hex} , F_{Acoet} e $F_{H/MeOH}$) das partes aéreas (folhas e caule) de *R. brasiliensis* frente às cepas *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*.

| Extratos/Frações de <i>R. brasiliensis</i> mg/mL | | Microorganismos | | | |
|--|-------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | | * <i>Staphylococcus aureus</i> | * <i>Escherichia coli</i> | * <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | * <i>Enterococcus faecalis</i> |
| EX_{EtOH} | 1:1 | 14,5 ± 0,5 | Inativo | Inativo | Inativo |
| | 1:10 | 14,0 ± 1,0 | Inativo | Inativo | Inativo |
| | 1:100 | Inativo | Inativo | Inativo | Inativo |
| F_{Hex} | 1:1 | 15,3 ± 1,1 | Inativo | Inativo | Inativo |
| | 1:10 | 8,7 ± 0,3 | Inativo | Inativo | Inativo |
| | 1:100 | Inativo | Inativo | Inativo | Inativo |
| F_{Acoet} | 1:1 | Inativo | Inativo | Inativo | Inativo |
| | 1:10 | Inativo | Inativo | Inativo | Inativo |
| | 1:100 | Inativo | Inativo | Inativo | Inativo |
| $F_{H/MeOH}$ | 1:1 | Inativo | Inativo | Inativo | Inativo |
| | 1:10 | Inativo | Inativo | Inativo | Inativo |
| | 1:100 | Inativo | Inativo | Inativo | Inativo |
| Gentamicina 10 mg | | 22 ± 0,1 | 23 ± 0,2 | 19 ± 0,6 | 21 ± 0,8 |
| DMSO | | Inativo | Inativo | Inativo | Inativo |

* media de 3 (três) repetições Ext.= Extrato bruto; Fr.= Frações obtidas da partição (F_{Hex} , F_{Acoet} e $F_{H/MeOH}$). *S. aureus* (ATCC 5923). *E. coli* (ATCC 25922). *P. aeruginosa* (ATCC 27853). *E. faecalis* (ATCC 29212).

A confirmação dos resultados neste trabalho está embasada nos ensaios realizados com o grupo controle negativo (dimetilssulfóxido - DMSO) e positivo (gentamicina). O primeiro não apresentou halo de inibição, portanto o solvente (DMSO), não interferiu no resultado, e o segundo mostrou um halo de inibição de 19 mm a 23 mm de diâmetro, indicando a sensibilidade ao antibiótico (Tabela 1). Estes resultados indicam que provavelmente para as cepas testadas os esteróides presentes no EX_{EtOH} e na F_{Hex} a classe de metabolito secundário que foi determinante na atividade.

A Tabela 2 apresenta os resultados dos testes de diluição seriada para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do EX_{EtOH} e das frações (hexânica; acetato de etila e hidrometanólica) das partes aéreas (folhas e caule) de *R. brasiliensis* frente à *S. aureus*.

Tabela 2: Concentração Mínima Inibitória (CMI) do extrato e frações observada frente à bactéria *Staphilococcus aureus* (ATCC 29213).

| Extrato e Frações | Concentração (mg.mL ⁻¹) | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-------------------------------------|------|------|-------|------|------|------|------|-------|-------|---|---|
| | 25 | 12,5 | 6,25 | 3,125 | 1,56 | 0,78 | 0,39 | 0,19 | 0,097 | 0,049 | 0 | |
| EX_{EtOH} | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| F_{Hex} | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| F_{Acoet} | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| $F_{H/MeOH}$ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Controle negativo | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Controle positivo | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Extrato etanólico bruto= EX_{EtOH} ; Fração Hexânica= F_{Hex} ; Fração acetato de etila= F_{Acoet} ; Fração hidrometanólica= $F_{H/MeOH}$.

A fração F_{Hex} de *R. brasiliensis* foi capazes de inibir a bactéria *S. aureus*, com valor de CMI de 6,25 mg/mL, menor concentração que inibiu completamente o crescimento da cepa testada. Para a fração F_{Acoet} esta inibiu

o crescimento da cepa apenas na concentração de 12,5 mg/mL, indicando que são necessárias concentrações relativamente altas desta fração para se obter uma inibição do crescimento bacteriano. A atividade antimicrobiana neste trabalho foi superior a reportada por Figueiredo *et al.*, (2009) que trabalharam com o extrato etanólico bruto das partes aéreas *R. Brasiliensis*, região de Goiás, cujo o extrato apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas não esporuladas e esporuladas e Gram negativas com CMI entre 0,37 mg/mL e 0,74 mg/mL.

4 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, observa-se que *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae) apresenta atividade antimicrobiana frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus*, importante patógeno humano causador de infecções hospitalares e que esta atividade pode estar ligada a presença dos esteróides. A respeito da atividade antioxidante esta deve estar ligada a presença dos compostos fenólicos e flavonóides na fração acetato de etila e para a fração hexânica os esteróides e triterpenos.

AGRADECIMENTOS: Ministério de Ciência e tecnologia (MCT); Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP); Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), ao Instituto Nacional de Áreas Úmidas (INAU) e Universidade Anhanguera – Uniderp.

3.1.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEKUNLE, A. A. Antifungal Property of the Crude Extracts of *Brachystegia Eurycoma* and *Richardia brasiliensis*. **Nig. J. Nat. Prod. and Med.**, v. 4, n. , p. 70-72, jan. 2000.

ADOLPHO, L. de O.; DALCOL, I. I. Isolamento e identificação de metabólitos de *Richardia brasiliensis* Gomes. In: 21ª Jornada Acadêmica Integrada, Santa Maria, junho 2007. **Anais...**, Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

COSTA, A. F. 2002. **Farmacognosia Volume I, II e III**. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2002.

CORREA, I.; CORREA, M. G. P.; MARIN, J. M. Antimicrobial susceptibility of strains of coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from mastitic bovine milk. **ARS Vet.**, v.21, p.69-76, 2005.

EDEOGA, H. O; OKWU, D. E.; MBAEBIE, B. O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 685-688, 2005.

FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; SOARES, M. L.; PIMENTA, F. C.; BARA, M. T. F.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. Avaliação da atividade antimicrobiana das partes aéreas (folhas e caules) e raízes de *Richardia brasiliensis* Gomez (Rubiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 65-68, 2009.

FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; SOARES, M. L.; BARA, M. T. F.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. Determinação de Parâmetros para Controle de Qualidade da *Richardia brasiliensis* (Rubiaceae). **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 29, n. 2, p. 192-197, 2010.

FONSECA, A. F. A. **Análises biométricas em café Conilon (*Coffea canephora* Pierre)**. 121p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1999.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas: plantas dicotiledôneas, por ordem alfabética de famílias de Geraniaceae a Verbenaceae**. 2. ed. São Paulo: BASF, v.3. 722 p.2000.

LEWIS W. H.; OLIVER R. L. Revision of *Richardia* (Rubiaceae). **Brittonia** 26: 271-301, 1974.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J Ethnopharmacol**, v.49, p.57–68, 1995.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 608 p.

MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M. S.; LIMA, A. S. **Processamento de sucos de frutas tropicais**. Fortaleza: Editora UFC, 2007. p 320.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, p. 45-64. 1997.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Dinâmica do banco de sementes em áreas com aplicação freqüente do herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 21, p.63-69, 2003

MONQUERO, P. A.; CURY, J. C.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Controle pelo glyphosate e caracterização geral da superfície foliar de *Commelina benghalensis*, *Ipomoea hederifolia*, *Richardia brasiliensis* e *Galinsoga parviflora*. **Planta Daninha**, v.23, p.123-132, 2005.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA. 2003. 58 p.

PEDRINHO JÚNIOR, A. F. F.; BIANCO, S.; PITELLI, R. A. Acúmulo de massa seca e macronutrientes por plantas de *Glycine max* e *Richardia brasiliensis*. **Planta Daninha**, v.22, n.1, p.53-61, 2004.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para qualificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Ver. Bras. Cienc. Farm.** N. 44, p. 683-689. 2008.

MUNOZ, O.; COPAJA, S.; SPEISKY, H.; PEÑA, R. C.; MONTENEGRO, G. Contenido de flavonoides y compuestos fenolicos de mieles chilenas e indice antioxidante. **Quím. Nova**, v.30, n.4, p.848-851. 2007.

PINTO, D. S.; TOMÁZ, A. C. A.; TAVARES, J. F.; TENÓRIO-SOUZA, F. H.; DIAS, C. da S.; BRAZ-FILHO, R.; DA-CUNHA, E. V. L. Secondary metabolites

isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 367-372, 2008.

RAZAVI, S. M.; NAZEMIYEH, H.;HAJIBOLAND, R.; KUMARASAMY, DELAZAR, A. NAHAR, L.; SARKER, S.D.; Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 1–5, 2008.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology Medicine**, v.20, n.7, p.933-956. 1996.

ROSA, E. A. da; SILVA, B. C. e; SILVA, F. M. da; TANAKA, C. M. A.; PERALTA, R. M.; OLIVEIRA, C. M. A. de; KATO, L.; FERREIRA, H. D.; SILVA, C. C. da. Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 20, p. 484-488. 2010.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia, Mecanismo das doenças infecciosas**. 3ed. Guanabara Koogan, 2002

SILVA, M. S. A.; SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; CARVALHO, A. A. T. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus offi cinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.18, v.2, p. 236-240, 2008.

SOUSA, C. M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA-JR G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, n.30 p.351-355, 2007.

THAIPONG K, BOONPRAKOB U, CROSBY K, CISNEROS-ZEVALLOS L, BYRNE D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **J Food Comps Anal**, v.19, p.669-675, 2006.

TOMAZ, A. C. de A.; NOGUEIRA, R. B. S. S.; PINTO, D. S.; AGRA, M. de F.; SOUZA, M. de F. V. de; DA-CUNHA, E. V. L. Chemical constituents from

Richardia grandiflora (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 18, p. 47-52. 2008

VAYA, J.; AVIRAM, M.; Nutritional antioxidants: mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. **Curr. Med. Chem. Imm. Endoc. Metab. Agent.**; v. 1, p. 99-117, 2001.

VOLK, G. M.; CRANE, J.; CASPERSEN, A. M.; HILL, L. M.; GARDNER C.; WALTERS, C. Massive cellular disruption occurs during early inhibitions of Cuphea seeds containing crystallized triacylglycerols. **Planta**, v.224, p.1415-1426, 2006.

WAGNER, H.; BLADT. S. **Plant drug analysis**. 3. ed. New York: Springer Verlag, 2009.

4. CAPÍTULO III

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO QUÍMICO DE *Richardia brasiliensis* GOMES E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Fernanda Sollberger Canale¹; Rosemary Matias^{1:2}

¹Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional
- Universidade Anhanguera-Uniderp. Rua Alexandre Herculano, 1.400, CEP
79.037-280, Campo Grande, Brasil.

²Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade Anhanguera-
Uniderp. Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP). Rua nove, n°. 305, CEP
78.068-410, Cuiabá, Brasil.

RESUMO - Devido a procura de formas alternativas ao controle de microrganismos responsáveis por perdas elevadas em diversas culturas alimentícias o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial fungicida do extrato e das frações de *R. brasiliensis* sobre *Lasiodiplodia theobromae* e *Colletotrichum gloeosporioides* e realizar o isolamento e a identificação das substâncias presentes nestas frações. O extrato bruto etanólico das partes aéreas de *R. brasiliensis*, coletada em Campo Grande-MS, foi particionado e as frações hexânica e acetato de etila, separadamente, foram submetidas a coluna de sílica-gel levando ao isolamento de esteróides e triterpenos ácidos respectivamente, a elucidação estrutural se deu por meio da análise dos espectros uni e bidimensionais de RMN ¹H e ¹³C e comparação com dados da literatura. Para determinação da atividade antifúngica foi utilizado 100 mL de uma solução estoque das amostras: extrato etanólico, fração hexânica e substância pura isolada (ácido oleanólico) com 5 µL de DMSO. Em meio de cultura BDA foram feitas placas contendo diferentes concentrações do extrato e frações (10; 20; 40; 80; 160 µg.100mL⁻¹). As placas foram incubadas a 22±2°C até que o crescimento micelial da testemunha atingisse a borda da placa.

Como testemunha foram utilizadas placas contendo apenas BDA com os fungos que permaneceram incubadas nas mesmas condições. Utilizou-se quatro repetições para cada uma das concentrações. A partir das análises dos espectros e com os dados da literatura foi identificado o β -sitosterol e uma mistura do β -sitosterol e estigmasterol. Para o tratamento do *Colletotrichum gloeosporioides* não houve diferença estatística entre os fatores extrato/fração x dosagem, porém todos foram ativos. O PIC apresentou maior nível de controle ocorreu utilizando a concentração de $160 \mu\text{g}$ em 100mL^{-1} para o Ex_{EtOH} (19,3 %), seguido do fração pura (17,2 %) e F_{Hex} (15,7 %). Para *Lasiodiplodia theobromae* houve interação significativa entre os fatores Extrato/Fração x Dosagem apenas para a fração pura em todas as concentrações e não ocorreu diferença entre os tratamentos com Ex_{EtOH} e F_{Hex} . A fração pura apresentou na concentração de $160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentou maior PIC (31,9%). É possível pensar que a atividade fungicida do Ex_{EtOH} e fração pura pode ocorrer em concentrações superiores às utilizadas no experimento e que a atividade fungicida pode estar ligada aos triterpenos.

Palavras-chave: Rubiaceae; fungicida natural; triterpenos e esteróides; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Lasiodiplodia theobromae*.

ABSTRACT- Because the demand for alternative ways to control microorganisms responsible for high losses in various food crops the objective of this study was to evaluate the potential fungicide extract and fractions of *R. brasiliensis* on *Lasiodiplodia theobromae* and *Colletotrichum gloeosporioides* and perform the isolation and identification of substances present in these fractions. The crude ethanol extract of the aerial parts of *R. brasiliensis* collected in Campo Grande was partitioned and the hexane fractions and ethyl acetate, separately, were subjected to silica gel column leading to the isolation of triterpene acids and steroids respectively, the structural elucidation was done by analysis of spectra and uni-dimensional ^1H and ^{13}C NMR and comparison with literature data. To determine the antifungal activity was used 100 mL of a stock solution of samples: ethanol extract, hexane fraction and isolated pure substance (oleanolic acid) at $5 \mu\text{l}$ of DMSO. In PDA culture medium were made

plates containing different concentrations of the extract and fractions (10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$). The plates were incubated at 22 ± 2 °C until mycelial growth reached the edge of the witness plate were used as control plates containing only PDA with fungal that remained incubated under the same conditions. We used four replicates for each concentration. From the analysis of the spectra and the literature was identified β -sitosterol and a mixture of β -sitosterol and stigmasterol. For the treatment of *Colletotrichum gloeosporioides* no statistical difference between the factors extract/fractionxdosage, but all were active. The PIC showed a higher level of control using the concentration was 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for EX_{EtOH} (19.3%), followed by pure fraction (17.2%) and F_{Hex} (15.7%). To *Lasiodiplodia theobromae* significant interaction between factors Extract/FractionxDosage just for pure fraction at all concentrations and no differences between treatments and EX_{EtOH} and F_{Hex} . The pure fraction showed the concentration of 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ showed the highest PIC (31.9%). It is possible to think that the fungicidal activity of the pure fraction EX_{EtOH} and can occur at concentrations higher than those used in the experiment and that the fungicidal activity may be linked to triterpenes.

Key-words: Rubiaceae; natural fungicide, triterpenes and steroids; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Lasiodiplodia theobromae*.

INTRODUÇÃO

As plantas produzem centenas de moléculas, substâncias para a sua defesa, regulação e adaptação, sendo assim biologicamente ativas. Algumas destas substâncias possuem atividade contra insetos, fungos, bactérias, patógenos em geral, como uma forma de defesa principalmente nos ambientes tropicais e equatoriais onde a biodiversidade de microorganismos e insetos é muito grande (SANTOS, 2005).

A família *Rubiaceae* vem sendo aos poucos explorada, seja por espécies de alto valor econômico, como a *Psychotria ipecacuanha* (medicinal) e a *Gardenia jasminoides* (ornamental), seja por espécies tóxicas como a

Palicourea marcgravii ou infestantes como a *Richardia brasiliensis* (KISSMANN; GROTH, 2000).

Entre as plantas desta família, colocamos em destaque a *Richardia brasiliensis* Gomes, cujos estudos encontrados na literatura estão voltados à área do agronegócio, devido a sua característica invasora de diversas lavouras, sua facilidade em se adaptar aos diferentes sistemas de plantio (direto e convencional), gerando sérios problemas por competir com a cultura e ser de difícil controle (PEDRINHO JÚNIOR *et al.*, 2004).

Na medicina popular a infusão ou o decocto das raízes de *R. brasiliensis* é empregada como expectorante, emética, diaforética, expectorante, vermífuga e para o tratamento de hemorróidas (AGRA *et al.*, 2007). Das atividades biológicas descritas para a espécie destaca-se a antimicrobiana (FIGUEREDO *et al.*, 2009) e antiviral (SIMÕES *et al.*, 1999).

Relatos de trabalhos realizados em Mato Grosso do Sul com a *R. brasiliensis* estão voltadas para a área agrônômica (ADEGAS *et al.*, 2010; GUGLIERI-CAPORAL *et al.*, 2011). Além de planta invasora é citada como uma das espécies da flora apícola da região na região de Dourados, Mato Grosso do Sul (D'APOLITO *et al.*, 2010).

Em razão de sua natureza invasiva, tanto em lavouras quanto na degradação de pastagens, esta planta está sendo eliminada sistematicamente por meio de herbicidas específicos (MONQUERO; CHRISTOFFOLETI, 2003; MONQUERO *et al.*, 2005; GOMES; CHRISTOFFOLETI, 2008), o que pode levar à extinção da espécie ainda pouco estudada farmacologicamente e fitoquimicamente.

Os estudos fitoquímicos desta espécie em diferentes regiões brasileiras demonstram divergências nos compostos encontrados. Na região da Paraíba, identificou-se a presença de flavonóides, triterpenos, cumarina e ácidos fenólicos (PINTO *et al.*, 2008). Nas partes aéreas, procedentes do Rio Grande do Sul, foram identificadas cumarinas, resinas, esteróides, triterpenóides, flavonóides e alcalóides (FIGUEREDO *et al.*, 2009; FIGUEREDO *et al.*, 2010).

Santos (2005) destaca a importância das plantas e de sua utilização em produtos naturais, alcançando vastos campos de aplicação tornando-se

importantes fontes de comercialização, agregando valores econômicos cada vez maiores aos produtos finais que os contém (nutracêuticos, cosmecêuticos, agrocêuticos). As plantas fornecem milhares de substâncias que podem ser utilizadas como fragrâncias, alimentos e/ou flavorizantes, bebidas, fibras, corantes, biocidas e reguladores do crescimento de outras plantas, ou seja, uma infinidade de aplicações que devem cada vez mais ser estudadas e utilizadas.

Pesquisas vêm revelando diversas substâncias que atuam sobre uma grande variedade de microorganismos, destacando-se entre eles os fungos. Pesquisadores têm encontrado atividade biológica a partir dos metabólitos secundários oriundos de plantas com a finalidade de obter novos compostos de comprovada eficácia para as diversas áreas (CECHINEL FILHO *et al.*, 1996).

Neste trabalho ressaltamos dois fungos, causadores de graves danos em frutas de uso comum da população brasileira, que são o *Lasiodiplodia theobromae* e o *Colletotrichum gloeosporioides*.

Diversas perdas em pós-colheita de frutas e sementes estão relacionadas à contaminação fúngica (MARCHEZAN, 2009). Uma das doenças mais importantes do maracujazeiro amarelo, do mamoeiro (TAVARES; SOUZA, 2005), da goiaba (FERRAZ, 2010), no morango (DIAS-ARIEIRA *et al.*, 2010), na cultura da atemóia (TAKAHASHI, 2008) na pós-colheita é a antracnose, causando manchas ou podridões na superfície dos frutos, podendo afetar folhas e ramos em todas as fases da planta, deixando o fruto impróprio para a comercialização, e o principal agente etiológico é o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (ALMEIDA; COELHO, 2007; FUGA *et al.*, 2011).

Lopes *et al.* (2009) objetivando conhecer o agente etiológico e o inseto vetor da morte-descendente-da-mangueira comprovaram ser o fungo *Lasiodiplodia theobromae* o agente causador da murcha, seca e desfolha progressiva dos ramos em direção ao caule, chegando a atingir o tronco da planta e provocando sua morte. Fungo responsável também pela “podridão-seca”, podendo atacar as mangueiras (MARQUES, 2010), videiras (RODRIGUES, 2003), o mamão (PEREIRA, 2009), em coqueiros (HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2005), em goiabeiras (CARDOSO *et al.*, 2005), além de já

ter sido relatado em cajueiro, cacauzeiro, guaranazeiro, mamoneira, gravioleira e ateira (RIBEIRO *et al.*, 2006)

Assim, com base no exposto e que pesquisas que envolvam a busca de novas tecnologias para o desenvolvimento de drogas mais eficazes constituem uma estratégia promissora, já que possibilita a iniciativa de prospecção de novas classes de moléculas naturais, capazes de neutralizar ou de danificar o patógeno-alvo, contribuindo como modelo para a síntese de novos produtos e ainda que a região possa influenciar na presença de metabólitos secundários e conseqüentemente na ação das espécies vegetais, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial fungicida do extrato e das frações de *Richardia brasiliensis* frente aos fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Lasiodiplodia theobromae* e realizar o isolamento químico.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do material vegetal e extratos: A planta *R. brasiliensis* foi coletada (folhas e caules) próxima à Horta de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Anhaguera – Uniderp, Campo Grande - MS, (20°26'20.64''S; 54°32'26.78''O), e um exsicata do exemplar encontra-se depositada no Herbário desta Instituição sob o número de registro 05052.

O material botânico foi limpo, seco em estufa de ventilação de ar à 45 °C (MARCON[®], MA35), por 3 dias, pesados, pulverizadas em moinho elétrico (MARCONI[®], MA048) e tamisado (malha n° 60). Do material processado, 760,5 g foram submetidas a extração com etanol (99,5 %). A extração ocorreu em banho de ultra-som por 60 minutos (UNIQUE[®], 1450) seguido por maceração, à temperatura ambiente, repetindo-se este procedimento até o esgotamento da droga, o que se deu em 15 dias. O solvente foi evaporado sob vácuo em evaporador rotativo (Tecnal[®], MA120), obtendo-se 19,8 g de extrato bruto etanólico.

Fracionamento químico: Para os ensaios de detecção dos diversos constituintes químicos parte do extrato etanólico ($EX_{EtOH} = 15,5$ g) foi dissolvido em metanol/água 1:1 (340 mL) e submetido à partição sucessivamente em

hexano (550 mL) e acetato de etila (750 mL). Após remoção dos solventes obteve-se as frações hexânica ($F_{\text{Hex}} = 4,1$ g), fração acetato de etila ($F_{\text{AcOEt}} = 3,2$ g) e a fração hidrometanólica ($F_{\text{H/MeOH}} = 7,1$ g).

Parte da F_{AcOEt} (2,2 g) foi fracionada em gel de sílica com misturas de hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) em ordem crescente de polaridade. A purificação por recristalização com acetona da sub-fração eluída em Hex:AcOEt à 20 % que forneceu uma mistura de duas substâncias codificadas como F_1 e F_2 (7,8 mg).

A F_{AcOEt} (2,0 g) foi submetida a coluna de sílica gel, utilizando como eluentes Hex, AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade. As sub-frações eluídas em Hex:AcOEt (75:25) forneceram após purificação em acetona:MeOH uma substância pura (22 mg), codificada como F_3 , e uma mistura (61,2 mg) contendo a substância F_3 e uma segunda substância codificada como F_4 . A elucidação estrutural ocorreu por meio da análise dos espectros uni e bidimensionais de RMN ^1H e ^{13}C e em comparação com dados da literatura (AKJHISA *et al.*, 1987; MAHATO; KUNDU, 1994; FALCÃO *et al.*, 2003; HUNG; YEN, 2001; TAKETA *et al.*, 2004).

Atividade antifúngica “*in vitro*”: As colônias puras dos fungos *Lasiodiplodia theobromae* e *Colletotrichum gloeosporioides*, registrados na coleção de culturas Maria de Menezes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, foram previamente repicados para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar) e mantidas em câmara climática tipo BOD durante 10 dias.

O extrato etanólico, a fração hexânica e a fração pura obtida do fracionamento da fração acetato de etila foram utilizadas para preparação de solução estoque ($0,05 \text{ g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$) contendo 5 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e completando o volume para 100 mL com álcool à 20%.

Uma alíquota de cada uma das amostras foi adicionada, separadamente, ao meio de cultura BDA fundente, de maneira que se obtivessem as concentrações de 10, 20, 40, 80 e 160 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de meio, sendo o mesmo vertido em placas de Petri, de 90 mm, no volume correspondente a 10

mL por placa. Após a solidificação do meio, foi repicado, no centro de cada placa, um disco de micélio com 5 cm de diâmetro retirado de uma das colônias jovens dos fungos.

Como testemunha foi utilizado placas contendo apenas BDA e disco de micélio e, também, o meio contendo BDA acrescido de solução de 5 µL de DMSO e 100 mL de solução hidroalcoólica à 20%, na concentração de 160 µg.mL⁻¹. Como a testemunha com DMSO não diferenciou da testemunha em branco, ela foi eliminada das análises estatísticas. As placas permaneceram incubadas em BOD a temperatura de 22±2°C. As avaliações ocorreram quando o crescimento micelial da testemunha atingiu a borda da placa.

A partir dos dados de crescimento micelial foi calculado a porcentagem de inibição do crescimento (PIC) para cada amostra em relação à testemunha (MENTEN *et al.*, 1976).

$$\text{PIC} = \frac{[(\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento})]}{\text{diâmetro da testemunha}} \times 100 = \%$$

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, para análise dos resultados, empregou-se a análise de covariância de acordo com Sokal; Rohlf (1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo químico de *Richardia brasiliensis* (partes aéreas) resultou no isolamento de dois esteroides, β-sitosterol (**F₁**) e uma mistura do β-sitosterol e estigmasterol (**F₂**) da fração hexânica (Figura 1).

$C_7-R=H$, β -sitosterol (F_1)

$C_8-R=H$, estigmaterol (Δ^{22}) (F_2)

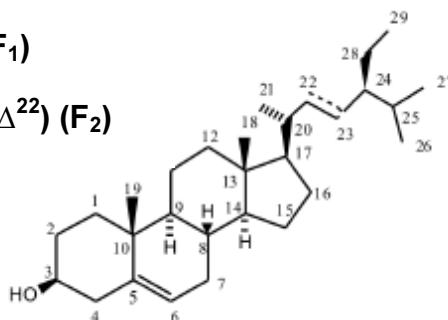
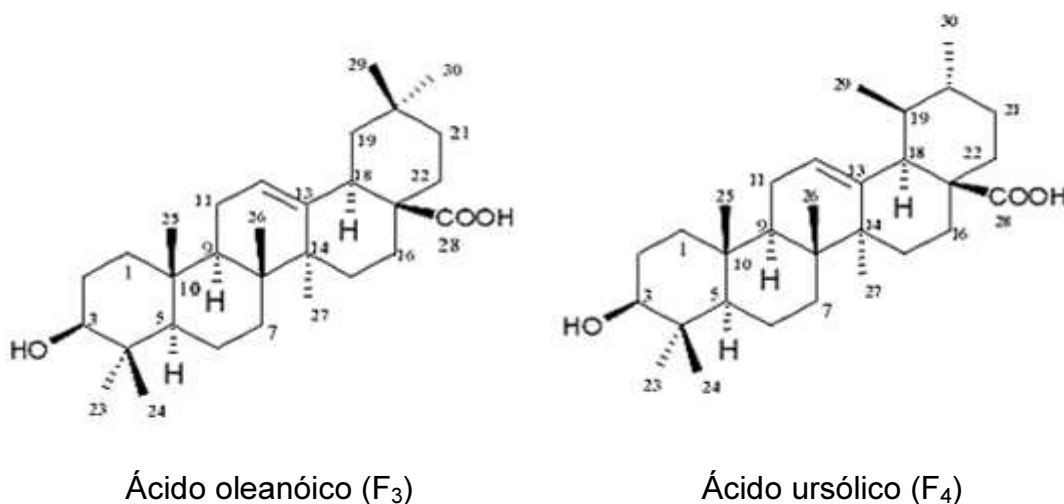


Figura 1: Estrutura do β -sitosterol (F_1) e estigmaterol (F_2) isolados da fração hexânica das partes aéreas de *R. brasiliensis*.

Na fração acetato de etila foi isolado o ácido oleanólico (F_3) e uma mistura de triterpenos contendo o ácido oleanólico e o ácido ursólico (F_4) (Figura 2). A elucidação estrutural ocorreu comparando os dados espectrais com os dados descritos na literatura para esteróides (AKJHISA *et al.*, 1987) e para triterpenos pentacíclicos (MAHATO; KUNDU, 1994; FALCÃO *et al.*, 2003; HUNG; YEN, 2001; TAKETA *et al.*, 2004).



Ácido oleanólico (F_3)

Ácido ursólico (F_4)

Figura 2: Estrutura dos triterpenos ácido oleanólico (F_3) e ácido ursólico (F_4) e isolados das partes aéreas de *R. brasiliensis*.

Recentemente, Pinto *et al.*, (2008) reportaram o isolamento e identificação de seis substâncias das folhas de *R. brasiliensis*, coletadas na região de Paraíba (Santa Rita). Entre as substâncias isoladas estão a

isorametina-3-O-rutinosídeo e a isorametina-3-O-rutinosídeo (flavonóides glicosilados), o ácido oleanólico (triterpeno), a cumarina escopoletina (cumarina) e os ácidos *p*-hidroxibenzóico e *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzóico (ácidos benzóicos). Apenas o ácido oleanólico foi concordante neste trabalho.

Com relação à atividade fungicida, o resultado da análise de co-variância entre o tipo de tratamento e dosagem utilizada em relação ao crescimento micelial (cm) indicou que não ocorreu diferença estatística na atividade antifúngica do extrato etanólico (EX_{EtOH}), da fração hexânica (F_{Hex}) e da Fração pura (ácido oleanólico) de *R. brasiliensis*, nas diferentes concentrações (10, 20, 40, 80 e 160 µg.100mL⁻¹) sobre o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, porém foi detectado ação dos três extratos sobre este fungo (Figuras 3).

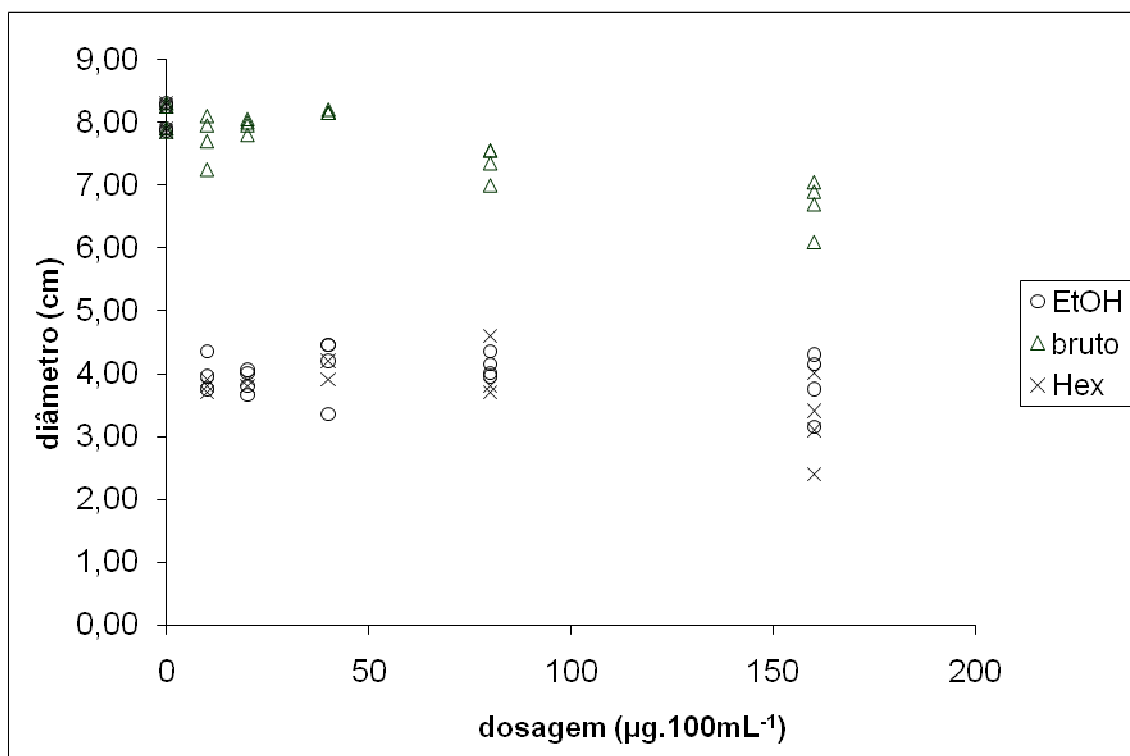


Figura 3: Gráfico representa a análise de co-variância entre os extrato/frações e dosagem utilizada em relação ao crescimento micelial (cm) de *Colletotrichum gloeosporioides*. EtOH = Extrato etanólico bruto; Hex= Fração Hexânica; Puro= fração pura = ácido oleanólico.

De acordo com a análise de co-variância, houve interação significativa entre os fatores Extrato/Fração x Dosagem apenas para a fração pura em todas as concentrações avaliadas em relação aos demais tratamentos. Não

ocorreu diferença estatística entre os fatores Extrato/Fração x Dosagens para os tratamentos com Ex_{EtOH} e F_{Hex} para o fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Figura 4).

Matthews e Haas (1993) relataram atividade do broto de café, uma Rubiaceae, para os fungos *Aspergillus niger* e *Penicilium camembertii*.

Chalfoun *et al.* (2000) observaram elevação do grau de inibição proporcionalmente à elevação nas concentrações de cafeína frente ao crescimento dos fungos *Fusarium* SP., *Cladosporium cladosporioides*, *A. niger* e *A. flavus*.

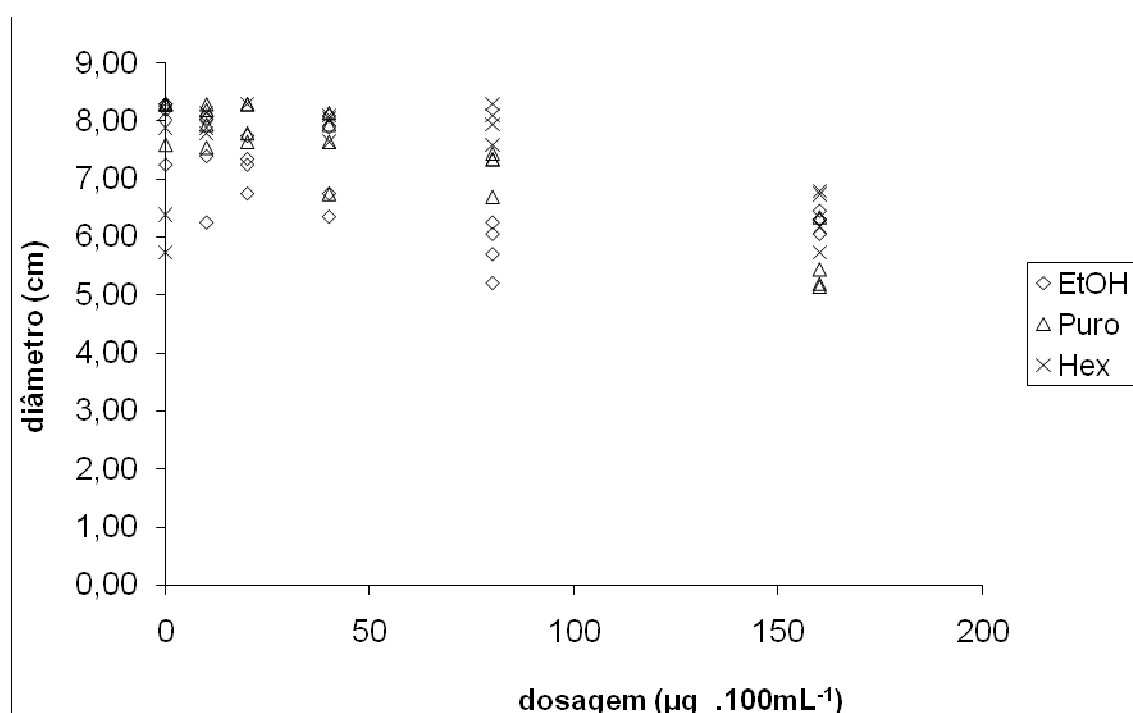


Figura 4: Gráfico representa a análise de co-variância entre os extrato/frações e dosagem utilizada em relação ao crescimento micelial (cm) de *Lasiodiplodia theobromae*. EtOH = Extrato etanólico bruto; Hex= Fração Hexânica; Puro= fração pura = ácido oleanólico.

A respeito da percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *C. gloeosporioides* foi verificado que o maior nível de controle ocorreu utilizando a concentração de $160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para o Ex_{EtOH} (19,3 %), seguido do fração pura (17,2 %) e F_{Hex} (15,7 %).

A atividade antifúngica sobre espécies de *Colletotrichum* já foi evidenciada por outros pesquisadores, utilizando principalmente o óleo de

eucalipto (*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson) e o óleo de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) os quais proporcionaram elevada redução no desenvolvimento fúngico nas maiores concentrações, com % de inibição superior a 50 % (BERNADO *et al.*, 1998).

O efeito inibitório no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, também foi observado por Ribeiro e Bedendo (1999) utilizando extratos aquosos de alho (*Allium sativum* L.), hortelã (*Mentha piperita* L.), mamona (*Ricinus communis* L.) e pimenta (*Capsicum* sp.) nas concentrações a partir de 200 mg/L.

Celoto *et al.* (2008) avaliaram os extratos aquosos e hidroetanólico de 22 espécies de plantas à 20%, os extratos que proporcionaram maior PIC foram o extrato aquoso (PIC = 90 %) e hidroetanólicos (PIC = 50 %) de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) e o extrato hidroetanólico (PIC = 50 %) de eucalipto (*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson).

Recentemente, Siqueira Júnior *et al.* (2011) verificaram potencial inibitório do crescimento de *C. gloeosporioides* com extratos, nas concentração de 10% (V/V), de boldo (*Plectranthus barbatus* Andr.) e espada-de-são-jorge (*Sansevieria trifasciata* L.), causando a redução de apenas 8% e 23%, respectivamente.

Em relação ao PIC para o patógeno *Lasiodiplodia theobromae* a fração contendo o ácido oleanólico na maior concentração ($160 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentou maior redução do diâmetro da colônia (31,9%) em relação às demais amostras. O Ex_{EtOH} proporcionou inibição do crescimento da colônia em todas as concentrações avaliadas e na concentração de $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ocorreu o maior nível de controle (27,6 %) deste patógeno, enquanto que na concentração de 160g/ml o PIC foi de 21,6%.

Neste trabalho, na fração hexânica foram isolados os esteróides β -sisterol e estigmasterol, e a fração pura corresponde ao ácido oleanólico, um triterpeno pentacíclico. Com base nestes dados pode-se inferir que provavelmente a classe de metabólito secundária responsável pela ação do extrato etanólico e da fração pura esteja ligado aos triterpenos para os patógenos estudados. Ao ácido ursólico e ao ácido oleanólico é apontado um

numero significativos de atividade entre elas a antifúngica citadas na revisão feita por Liu (1995).

Figueiredo *et al.* (2010) evidenciaram atividade fungistática da cera cuticular de *Jatropha curcas* L. sobre *C. gloeosporioides* e esta atividade foi atribuída a β -amirina, um triterpeno pentacíclico da mesma classe do ácido ursólico e oleanólico isolados neste trabalho.

No trabalho realizado por Adekunle (2000) empregando o extrato aquoso e o extrato etanólico, das folhas de *R. brasiliensis*, sobre nove fungos (*Aspergillus flavus*; *A. fumigatus*; *A. niger*; *A. albicans*; *Epidermophyion floccosium*; *Fusarium solani*; *Mucor mucedo*; *Microsporium audonii* e *Trichophyton verrucosum*) na concentração de 100 mg/mL, foi constatado que o extrato etanólico contendo alcalóides, flavonóides, antraquinonas, tanino, saponinas e esteróides foi mais ativo do que o extrato aquoso que apresentou como classe de metabólito secundário predominante os taninos.

Feitosa *et al.*, (2000) testaram o extrato bruto e sumo de algumas plantas medicinais sobre fungos cultivados em meio BDA, a tintura de juá (*Ziziphus joazeiro* Mart.) à 20% reduziu em 62 % o crescimento de *L. theobromae*.

Lins *et al.* (2012), avaliaram os extratos de alho (*Allium sativum*), melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) e casca de manga (*Mangifera indica*) no controle da podridão peduncular em manga causado por *L. theobromae* e constaram que a eficiência dos extratos é dependente das concentrações testadas (25%, 50% e 75%) e deve estar ligada aos metabólitos secundários presentes, como ocorreu em nosso estudo, contudo em concentrações inferiores as citadas.

CONCLUSÃO

De acordo com as substâncias isoladas e frente aos ensaios realizados *in vitro* com o extrato etanólico e frações de *R. brasilienses*, conclui-se que o extrato etanólico e a fração pura em concentrações iguais e superiores a 160 μ g/100mL surge como uma alternativa para o controle de fitopatógenos.

AGRADECIMENTOS: Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP); Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), ao Instituto Nacional de Áreas Úmidas (INAU) e Universidade Anhaguera – Uniderp.

4.1.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGAS, F. S.; OLIVEIRA, M. F.; VIEIRA, O. V.; PRETE, C. E. C.; GAZZIERO, D. L. P.; VOLL, E. Levantamento fitossociológico de plantas daninhas na cultura do girassol. **Planta Daninha**, v.28, n. 4, p. 705-716. 2010.

ADEKUNLE, A. A. Antifungal Property of the Crude Extracts of *Brachystegia eurycoma* and *Richardia brasiliensis*. **Nig. J. Nat. Prod. and Med.**, v. 4, p. 70-72, 2000.

AGRA M. F.; FRANÇA P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 17: 114-140. 2007

AKJHISA, T.; SHIMIZU, N.; GHOSH, P.; THAKUR, S.; ROSENSTEIN, F. U.; TAMURA, T.; MATSUMOTO, T. Sterols of the cucurbitaceae. **Phytochemistry**, v.26, n.6, p.1693-1700. 1987

ALMEIDA, L. C. C.; COELHO, R. S. B. Caracterização da Agressividade de Isolados de *Colletotrichum* de Maracujá Amarelo com Marcadores Bioquímico, Fisiológico e Molecular. **Fitopatol. Bras**, v. 32, n. 4, p. 1-11, 2007.

BERNARDO, R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, S. F. Fungitoxicidade de alguns óleos essenciais contra fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 227, 1998.

CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M.; TESSARI, E. N .C.; BALDASSI, L.; PINHEIRO, E. S. Pesquisa de Salmonella spp, coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. **Higiene Alimentar**, v.19, n.128, p.144-150, 2005.

CECHINEL FILHO, V.; QUEIROZ, E. F.; LIMA, E de O.; PINHEIRO, T. R.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A. Síntese de N-alkilfenilmaleimidas e N-alkillarilmaleimidas com atividade antifúngica. **Química Nova**. v.19, n.6, p.590-593, 1996.

CELOTO, M. I. B.; PAPA, M de F. S.; SACRAMENTO, L. V. S. do; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Sci. Agron**. v. 30, n. 1, p. 1-5, Maringá, SP. 2008.

D'APOLITO, C.; PESSOA, S. M.; BALESTIERI, F. C. L. M.; BALESTIERI, J. B. P. Pollen harvest by *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) in the Dourados region, Mato Grosso do Sul state (Brazil). **Acta bot. bras.**, v.24, n.4, p. 898-904. 2010.

DIAS-ARIEIRA, C. R.; FERREIRA, L. R.; ARIEIRA, J. O.; GONÇALVES MIGUEL, E.; DONEGA, M. A.; RIBEIRO, R. C. F. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. **Summa Phytopathol**, v. 36, n. 3, p. 228-232, 2010.

FALCÃO, D. Q.; FERNANDES, S. B. O.; MENEZES, F. S. Triterpenos de *Hyptis fasciculata* Benth. **Rev. Bras. Farmacogn**. v. 13, supl., p. 81-83. 2003.

FEITOSA, V. S.; PESSOA, M. N. G.; ALMEIDA, J. L.; SILVA, M. G. V. Efeito da tintura, extrato bruto e sumo de plantas medicinais sobre o crescimento micelial de *Coletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Macrophomina phaseolina* "in vitro". In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, XXXIII, 2000, **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, suplemento, p. 374, ago. 2000.

FERRAZ, D. M. M. **Controle da Antracnose (*colletotrichum gloeosporioides*) em pós-colheita da goiaba (*Psidium guajava*), produzida em sistema de cultivo convencional e orgânico, pela aplicação de fosfitos, hidrotermia e cloreto de cálcio**. 2010. 119 f. Dissertação (Mestre em Fitopatologia)-Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, Brasília, DF, 2010.

FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; SOARES, M. L.; BARA, M. T. F.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F. ; PAULA, J. R. Determinação de Parâmetros para Controle de Qualidade da

Richardia brasiliensis (Rubiaceae). **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 29, n. 2, p. 192-197, 2010.

FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; SOARES, M. L.; PIMENTA, F. C.; BARA, M. T. F.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. Avaliação da atividade antimicrobiana das partes aéreas (folhas e caules) e raízes de *Richardia brasiliensis* Gomez (Rubiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 65-68, 2009.

FUGA, C. A. G.; GONÇALVES, D. C.; CUNHA, W. V. da. Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* por *Bacillus spp.* "in vitro". **Perquirere**, v. 8, n. 1, p. 188-194, 2011.

GOMES JR., F. G.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Biologia e manejo de plantas daninhas em áreas de plantio direto. **Planta Daninha**, v. 26, n. 4, p. 789-798, 2008.

GUGLIERI-CAPORAL, A.; CAPORAL, F. J. M.; KUFNER, D. C. L.; ALVES, F. M. Flora invasora de cultivos de aveia-preta, milho e sorgo em região de cerrado do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Bragantia**, v. 70, n. 2, p.247-254, 2011.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. de L. Queda de frutos em coqueiro causada por *Lasiodiplodia theobromae* em Roraima. **Fitopatol. Bras**, v.30, n.2, p.203-203. 2005.

HUNG, C. Y.; YEN, G. C. Extraction and Identification of Antioxidative Components of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl.). **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v.34, p.306-311. 2001.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas: plantas dicotiledôneas**, por ordem alfabética de famílias de Geraniaceae a Verbenaceae. 2. ed. São Paulo: BASF, v.3. 722 p. 2000.

LINS, S. R. de O.; OLIVEIRA, S. M. A. de; XAVIER, H. S.; RANDAU, K. P. Prospecção fitoquímica de extratos de plantas e controle da podridão peduncular. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.7, n.1, p.97-103. Recife, PE, 2012.

em manga

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J Ethnopharmacol**, v.49, p.57–68. 1995.

LOPES, E. B.; BRITO, C. H. de; ARAÚJO, L. H. A.; NASCIMENTO, L. C. do; BATISTA, J. de L. Etiologia e inseto vetor da morte-descendente-da-mangueira (*Mangifera indica*) no Estado da Paraíba. **Tecnol. & Ciên. Agropec**, v. 32, n. 1, p. 37-40, 2009.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v.37, n.6, p.1517-1575. 1994.

MARCHEZAN, A. **Contribuição para o estudo químico de *Turnera ulmifolia* (turneraceae) e atividade antifúngica e antioxidante**. 2009. 10 p. Pesquisa Científica (Mestrado em Produção e Gestão Agraindustrial)-Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande, MS, 2009.

MARQUES, M. W. Compatibilidade vegetativa de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* associadas à cultura da mangueira. In: X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2010, Recife. **Anais...Recife: JEPEX**, p. 1-3. 2010.

MENTEN, J. O. M.; MACHADO, C. C.; MINUSSI, E. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. “*in vitro*”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.1, n.2, p.57-66, 1976.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Dinâmica do banco de sementes em áreas com aplicação freqüente do herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 21, p.63-69, 2003

MONQUERO, P. A.; CURY, J. C.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Controle pelo glyphosate e caracterização geral da superfície foliar de *Commelina benghalensis*, *Ipomoea hederifolia*, *Richardia brasiliensis* e *Galinsoga parviflora*. **Planta Daninha**, v.23, p.123-132, 2005.

PEDRINHO JÚNIOR, A. F. F.; BIANCO, S.; PITELLI, R. A. Acúmulo de massa seca e macronutrientes por plantas de *Glycine max* e *Richardia brasiliensis*. **Planta Daninha**, v.22, n.1, p.53-61, 2004.

- PEREIRA, A. V. da S. **Sensibilidade a Fungicidas e Adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobromae* Patogênico ao Mamão**. 2009.58 f. Dissertação (Mestre em Fitopatologia)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2009.
- PINTO, D. S.; TOMÁZ, A. C. A.; TAVARES, J. F.; TENÓRIO-SOUZA, F. H.; DIAS, C. da S.; BRAZ-FILHO, R.; DA-CUNHA, E. V. L. Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 367-372, 2008.
- RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* – agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agrícola**, v. 56, n.1 (suplemento), 8 p., 1999.
- RIBEIRO, V. Q.; SILVA, G. S.; PEREIRA, A. L. Caracterização Fisiológica, Cultural e Patogênica de Diferentes Isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatol. Bras**, v. 31, n. 6, p. 203-203, 2006.
- RODRIGUES, R. **Caracterização morfológica e patológica de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., agente causal das podridões de tronco e raízes da videira**. 2003. 68 p. Dissertação (Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical)-Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP, 2003.
- SANTOS, L. de Á. **Estudo químico e das atividades citotóxica, antioxidante e antifúngica de *Prunus myrtifolia* L. (Urban.) (ROSACEAE)**. 2005. 198p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista. Araraquara, SP, 2005.
- SIMÕES C. M. O.; SCHENKEL E. P.; GOSMANN G.; MELLO J. C. P.; MENTZ L. A.; PETROVICK P. R. 1999. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora UFRS/UFSC, 1999.
- SIQUEIRA JÚNIOR, C. L.; MORAES, T. C.; MARTINS, J. A. B.; FREIRE, M. G. M. Controle da antracnose em mamão por extratos vegetais. **Perspectivas on-line**, v.1, n.1, 2011.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. 3th edition. W. H. Freeman and Co.: New York. 937 p. 1995.

TAKAHASHI, L. M. **Identificação de *Colletotrichum gloeosporioides* de atemóia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*), por meio de caracterização patogênica, cultural e morfológica**. 2008. 52 f. Dissertação (Mestre em Agronomia)-Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, SP, 2008.

TAKETA, A. T. C.; BREITMAIER, E.; SCHENKEL, E. P. Triterpenes and Triterpenoidal Glycosides from the Fruits of *Ilex paraguariensis* (Maté). **Braz. Chem. Soc.** v.15, n.2, p.205-211. 2004.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. de. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciênc. agrotec**, v. 29, n

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Plantas que foram originalmente adicionadas para melhorar o paladar, podem também melhorar a segurança e o tempo de vida útil dos produtos alimentícios. Vários estudos, como já descrito neste trabalho, têm mostrado a aplicação, importância e isolamento de extrato e frações derivados de plantas. Alguns mostraram ter maior atividade antimicrobiana, quando comparados com uma mistura de grandes componentes outros relatam possível atividade antifúngica, há, ainda, a propensão a ações antioxidantes.

No entanto, informações sobre os efeitos destes compostos naturais e/ou em combinação com extratos contra microorganismos de origem alimentar são limitadas. O futuro requer muita pesquisa com relação aos produtos alimentícios antimicrobianos naturais, em especial sobre a eficácia dos óleos essenciais, individualmente ou em combinação com outros extratos de plantas, sendo um tema de especial interesse nas ciências da nutrição e da alimentação, pelos efeitos protetores de alguns destes compostos, e na higiene e segurança alimentar, pelo papel de conservação que possam desempenhar.