



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

EMMELINE DE SÁ ROCHA

**PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS COM ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA A PARTIR DO EXTRATO DAS FOLHAS
DE *Platonia insignis* Mart. (BACURI)**

**SÃO LUIS
2017**



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

EMMELINE DE SÁ ROCHA

**PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS COM ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA A PARTIR DO EXTRATO DAS FOLHAS
DE *Platonia insignis* Mart. (BACURI)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dra. Patricia de Maria Silva Figueiredo

Co-orientador: Prof. Dra. Claudia Quintino da Rocha

**SÃO LUIS
2017**

R672p Rocha, Emmeline de Sá.
PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS COM ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA A PARTIR DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Platonia
insignis* Mart. (BACURI). / Emmeline de Sá Rocha. – Gurupi, TO, 2017.
68 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em
Biotecnologia, 2017.

Orientadora : Patricia de Maria Silva Figueiredo

Coorientadora : Claudia Quintino da Rocha

1. Antibacteriano. 2. Antioxidante. 3. Bacurizeiro. 4. Fitoterápicos . I.
Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

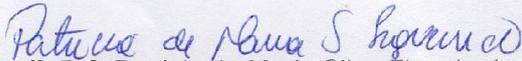
Rua Badejós, Chácaras 69 e 72 - CEP: 77402-970 - Caixa Postal 66 | Gurupi/TO
(63) 3311-3549 | www.uft.edu.br/biotecnologia | ppgbiotec@uft.edu.br

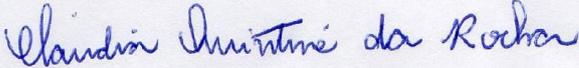


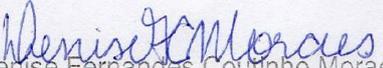
Ata de Defesa nº 34/2017

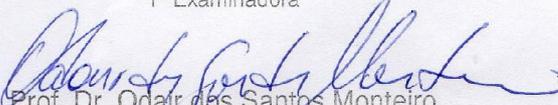
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de EMMELINE DE SÁ ROCHA DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS.

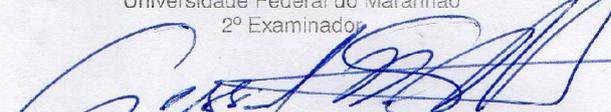
Aos 04 dias do mês de agosto do ano de 2017, às 14:30 horas, na sala II, edifício do departamento de farmácia, campus de São Luis, da Universidade Federal do Maranhão, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof^a. Orientadora Dr^a. PATRICIA DE MARIA SILVA FIGUEIREDO da Universidade Federal do Maranhão, Prof^a. Dr^a. CLAUDIA QUINTINO DA ROCHA da Universidade do Maranhão, Prof^a Dr^a DENISE FERNANDES COUTINHO MORAES da Universidade Federal do Maranhão, Prof Dr ODAIR DOS SANTOS MONTEIRO da Universidade Federal do Maranhão e Prof Dr GESSIEL NEWTON SCHEIDT da Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência da primeira, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de EMMELINE DE SÁ ROCHA, intitulada "**Produção de bioprodutos com atividade antimicrobiana a partir do extrato das folhas de *Platonia insignis* mart. (bacuri)**". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, com as devidas correções apontadas pela banca, habilitando-a ao título de Mestre em Biotecnologia. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof^a. Dr^a. Patricia de Maria Silva Figueiredo
Universidade Federal do Maranhão
Orientadora

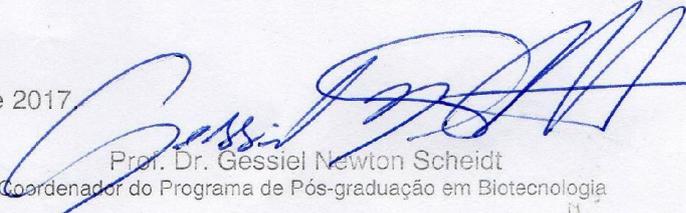

Prof^a Dr^a Claudia Quintino da Rocha
Universidade Federal do Maranhão
Coorientadora


Prof^a. Dr^a. Denise Fernandes Coutinho Moraes
Universidade Federal do Maranhão
1^a Examinadora


Prof. Dr. Odair dos Santos Monteiro
Universidade Federal do Maranhão
2^o Examinador


Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt
Universidade Federal do Tocantins
3^o Examinador

São Luis, 04 de agosto de 2017


Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade, por ter iluminado, abençoado a minha vida todos os dias.

A minha família amada pelo apoio incondicional, aos meus pais sempre incentivando eis estudos, com amor e compreensão, meus irmãos pelo companheirismo, por toda ajuda sempre que preciso, ao pequeno... João Lucas, que me traz esperança e paz nos dias difíceis.

João Marcos, obrigada por todo amor, toda compreensão pelo apoio de todos os dias.

A professora Dr^a Patricia de Maria Silva Figueiredo pela orientação e pela oportunidade de realizar este trabalho, conduzindo-o da melhor forma possível.

Ao Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão especialmente a professora Dr^a Cláudia Quintino da Rocha por ter generosamente me passado tanto conhecimento em tão pouco tempo, foi fundamental. Ao professor Dr^o Odair Monteiro, Natale e Marcos Bispo pelas contribuições.

A professora Dr^a Denise Coutinho Moraes e ao Laboratório de Farmacognosia, a Tássio Romulo e Antônio Leite pela ajuda.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Federal do Maranhão, em especial, Ribamar Junior, Hugo Leonardo, Leandra, Denise, Luciene, Alzyrene, Juliana, Ana Clara, Larissa por estarem sempre presente ajudando no que fosse possível. A Margareth pela energia, carinho e compreensão que passa para gente todos os dias... vocês tornam os dias mais leves.

Aos amigos que fiz em Gurupi, especialmente Patrícia Mourato e Flavia Araújo que me receberam e acolheram com todo carinho. A Caroline Tunes, Polliana Peixoto, Patrícia Verdugo pela amizade e companheirismo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Obrigado a todos que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

"Grande coisa é haver recebido do céu uma partícula da sabedoria, o dom de achar as relações das coisas, a faculdade de as comparar e o talento de concluir!" (Machado de Assis - Memórias póstumas de Brás Cubas)

RESUMO

Platonia insignis Mart. é uma espécie pertencente à família Clusiaceae, é popularmente conhecida como Bacuri e muito conhecida por ter um fruto de sabor apreciado. A utilização etnobotânica está relacionada à utilização do extrato do óleo de suas sementes como cicatrizante e anti-inflamatório e na produção de sabão. Atualmente diversas atividades vêm sendo relatadas para todas as partes deste fruto (semente, casca e polpa). Este trabalho teve como objetivo analisar o perfil fitoquímico, atividade antimicrobiana do extrato das folhas de *Platonia insignis* Mart. e desenvolver formulações farmacêuticas com ação antimicrobiana. A análise fitoquímica do extrato mostrou a presença de fenóis (taninos condensados, catequinas e flavonoides), esteroides, alcaloides e saponinas. As análises por LC-MSⁿ forneceram os perfis de fragmentação dos compostos presentes no extrato. Na fração acetato de etila, foi identificado a fukugentina (morelloflavona) um importante marcador da família Clusiaceae. O extrato apresentou potencial antioxidante com inibição de 88,06% do radical DPPH. O sabonete, o creme e a solução tópica manipulados a partir do extrato a 1 e a 5% tiveram sua estabilidade analisadas no tempo zero e trinta dias após formulados, além da avaliação do controle de qualidade microbiológico. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo; o extrato hidroetanólico (70%), as frações hexânica, acetato de etila e os produtos manipulados apresentaram atividade antimicrobiana com CIM entre 0,78 e 12,5 mg/mL frente a todos os microrganismos testados exceto as frações orgânicas (acetato de etila e hexânica) que não apresentaram atividade frente *Acinetobacter baumannii*. A toxicidade avaliada pela técnica de hemólise não demonstrou atividade hemolítica até concentração testada de 100mg/mL. A toxicidade frente *Artemia salina* demonstrou que o extrato apresentou DL50 de 42,6 µg/mL sendo classificado como altamente tóxico frente *Artemia salina*. O extrato possui atividade antioxidante, microbicida e baixa toxicidade *in vitro*. As formulações farmacêuticas mostraram-se potencialmente viáveis no desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de doenças infecciosas.

Palavras-chave: Antibacteriano; Antioxidante; Bacurizeiro; Fitoterápicos.

ABSTRACT

Platonia insignis Mart. is a species belonging to Clusiaceae, is popularly known as Bacuri and is well-known for having a fruit of appreciated flavor. The ethnopharmacological use is related to the use of the oil of its seeds in the healing of scars and as an anti-inflammatory and in the production of soap. Currently, several activities have been reported for all parts of this fruit (seed, bark and pulp). This work aimed to analyze the phytochemical profile, biological, and antimicrobial activity of the leaf extract of *Platonia insignis* Mart., and develop pharmaceutical formulations. Phytochemical analysis of the extract showed the presence of phenols, condensed tannins, catechins, steroids, alkaloids, flavonoids and saponins. Analyzes by LC-MS and FIA-ESI-IT/MSⁿ provided the fragmentation profiles of the compounds present in the extract and their structures were proposed. In the ethyl acetate fraction, fukugentin (morelloflavone) was identified as an important marker of the clusiaceae family. The extract presented antioxidant potential in the inhibition of 88,06% of the DPPH radical. The soap and the topical solution manipulated from the 1 and 5% extract had their stability analyzed at time zero and thirty days after formulations, besides the evaluation of the microbiological quality control. The antimicrobial activity was evaluated by the microdilution technique. The hydroethanolic extract (70%), the hexane, ethyl acetate and the manipulated products presented antimicrobial activity with MIC between 0.78 and 12.5 mg/mL to all the microorganisms tested except the organic fractions (ethyl acetate and hexane) that showed no activity against *Acinetobacter baumannii*. The toxicity evaluated by the hemolysis technique did not demonstrate hemolytic activity up to a concentration of 100 mg/mL. Toxicity to *Artemia salina* showed that the extract had LD50 of 42.6 µg/mL being classified as highly toxic against *Artemia salina*. The extract has antioxidant activity, microbicide and low in vitro toxicity. Pharmaceutical formulations have proved potentially viable in the development of novel products for the treatment of infectious diseases.

Keywords: Antibacterial; Antioxidant; Bacurizeiro; Phytotherapics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Constituintes químicos identificados na fração hexânica (a) , (b) e (c) e os constituintes identificados no extrato bruto de <i>Platonia insignis</i> (d) , (e) e (f)	39
Figura 2 – Constituintes químicos identificados na fração acetato de etila de <i>Platonia insignis</i>	40
Figura 3 – Atividade antioxidante (%) por inibição do DPPH do extrato de <i>Platonia insingnis</i>	42
Figura 4 – Cinética da reação de inibição do DPPH (%) do extrato de <i>Platonia insignis</i>	43
Figura 5 – Porcentagem de larvas de <i>Artemia salina</i> mortas em relação às concentrações do extrato de <i>Platonia insignis</i>	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulações desenvolvidas a partir do extrato hidroetanólico (70%): solução tópica, creme e sabonete íntimo.....	28
Tabela 2 – Avaliação qualitativa e semi-quantitativa dos constituintes químicos no extrato hidroetanólico das folhas de Bacuri (<i>Platonia insignis</i> Mart.).....	36
Tabela 3 – Compostos identificados por LC-MS e FIA-ESI-IT-MS do extrato de <i>Platonia insignis</i>	37
Tabela 4 - Dados de Atividade Antioxidante (%) do extrato das folhas de <i>Platonia insignis</i>	41
Tabela 5 – Avaliação organoléptica e determinação de pH no T0 (tempo zero) e após 30 dias da formulação do sabonete íntimo de <i>Platonia insignis</i> Mart. (Bacuri) a 1 e a 5% submetida a diferentes condições de armazenamento	45
Tabela 6 – Avaliação organoléptica e determinação de pH no T0 (tempo zero) e após 30 dias da formulação do creme de <i>Platonia insignis</i> Mart. (Bacuri) a 1 e a 5% submetida a diferentes condições de armazenamento	46
Tabela 7 – Avaliação organoléptica e determinação de pH no T0 (tempo zero) e após 30 dias da formulação da solução tópica de <i>Platonia insignis</i> Mart. (Bacuri) a 1 e a 5% submetida a diferentes condições de armazenamento	47
Tabela 8 – Atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroetanólico (a 70%) a partir das folhas de <i>Platonia insignis</i> Mart. (Bacuri)	50
Tabela 9 – Classificação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais segundo Duarte (2005)	50
Tabela 10 – Atividade antimicrobiana das frações Hexânica, Acetato de Etila e aquosa obtidas a partir do extrato hidroalcoólico de <i>Platonia insignis</i> Mart. (Bacuri).....	41
Tabela 11 – Atividade antimicrobiana do sabonete íntimo, creme e solução para uso tópico a 1% manipulados a partir do extrato de <i>Platonia insignis</i> Mart. (Bacuri)	53
Tabela 12 – Atividade antimicrobiana do sabonete íntimo, creme e solução para uso tópico a 5% manipulados a partir do extrato de <i>Platonia insignis</i> Mart. (Bacuri)	54
Tabela 13 – Valores das H_{50} , dos ID e da razão H_{50}/ID do extrato das folhas de <i>Platonia insignis</i> Mart. (Bacuri)	56
Tabela 14 - Toxicidade do extrato de <i>Platonia insignis</i> frente às larvas de <i>A. salina</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC – American Type Culture Collection
BHI – Brain Heart Infusion
BHT – Hidroxitolueno butilado
CBM – Concentração Bactericida Mínima
CIM – Concentração Inibitória Mínima
DL₅₀ - Dose necessária de uma dada substância matar 50% de uma população em teste
CE₅₀ - Concentração da amostra responsável pelo efeito em 50 % dos organismos testados
CL₅₀ - Concentração da amostra responsável pelo efeito em 50 % dos organismos testados
DPPH – 1,1-difenil-2-picrildazila
EtOH – Extrato hidroetanolico
EH – Extrato hidroalcolico
H₅₀ -dose efetiva que causa 50% de hemólise
ID – Índice de Desnaturação
IN - Indeterminado
INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial
MeOH – Metanol
N.D – Não Determinado
N.I – Não Identificado
PCA – Plate Count Agar
pH - potencial Hidrogeniônico
UFMA – Universidade Federal do Maranhão
UFT – Universidade Federal do Tocantins
UV – Ultravioleta
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)
DMSO – Dimetilsufóxido
SNC – Sistema Nervoso Central
ABTS – 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
UFC – Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Família Clusiaceae	16
2.2 Gênero <i>Platonia</i>	16
2.3 Atividade antioxidante	17
2.4 Atividade antimicrobiana de produtos naturais	18
2.5 Resistência microbiana	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral.....	21
3.2 Objetivos Específicos.....	21
4 METODOLOGIA	22
4.1 Coleta e identificação do material botânico	22
4.2 Obtenção do extrato hidroetanólico	22
4.3 Fracionamento por partição líquido-líquido.....	22
4.4 Screening fitoquímico.....	23
4.4.1 Teste para Fenóis e Taninos.....	23
4.4.2 Teste para Flavonoides	23
4.4.3 Teste para Cumarinas	24
4.4.4 Teste para Alcaloides	24
4.4.5 Teste para Triterpenos e Esteroides	24
4.4.6 Teste para Saponinas	25
4.5 Caracterização por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrometria de Massas (LC-ESI-IT-MS).....	25
4.5.1 Extração em fase sólida	25
4.5.2 Análises de LC-MS	25
4.5.3 Análise por FIA-ESI-IT-MS	26
4.6 Atividade antioxidante	27
4.7 Manipulação dos bioprodutos.....	28
4.8 Análise de estabilidade e controle de qualidade das formulações farmacêuticas	29
4.9 Teste de centrifugação.....	29
4.10 Avaliações organolépticas	29
4.11 Determinação de pH.....	29
4.12 Determinação de viscosidade	30
4.13 Controle de qualidade microbiológico das formulações	30
4.14 Atividade antimicrobiana: extrato bruto, frações e formulações	31
4.14.1 Seleção das cepas bacterianas	31
4.14.2 Preparo das suspensões microbianas	31
4.15 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	31
4.16 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	32
4.17 Avaliação da atividade hemolítica do extrato das folhas de <i>P. insignis</i>	32
4.17.1 Isolamento das hemácias (Preparo da suspensão de hemácias)	32
4.17.2 Avaliação da IC ₅₀ (50% de inibição de atividade hemolítica)	32
4.17.3 Hemólise	33
4.17.4 Desnaturação	33
4.18 Toxicidade frente às larvas de <i>Aartemia salina</i> Leach	33
4.18.1 Cultura das larvas de <i>Artemia salina</i> Leach.....	34
4.18.2 Preparo das amostras e determinação do valor da DL ₅₀	34

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1 Rendimento do extrato	35
5.2 Triagem fitoquímica	35
5.3 Substâncias identificadas no extrato das folhas de <i>Platonia insignis</i> Mart	39
5.4 Atividade antioxidante do extrato a partir das folhas de <i>Platonia insignis</i>	41
5.5 Análise de estabilidade das formulações farmacêuticas	44
5.5.1 Determinação da viscosidade.....	48
5.5.2 Controle de Qualidade Microbiológico das formulações	48
5.6 Atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico (70%) a partir das folhas de <i>Platonia insignis</i> Mart. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima - CIM e CBM)	49
5.7 Atividade antimicrobiana das frações acetato de etila, hexânica e aquosa a partir das folhas de <i>Platonia insignis</i> Mart.	51
5.8 Atividade antimicrobiana dos bioprodutos manipulados a partir do extrato hidroetanólico (70%) das folhas de <i>Platonia insignis</i> Mart.	53
5.9 Avaliação da atividade hemolítica do extrato das folhas de <i>P. insignis</i>	55
5.10 Atividade toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	56
6 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

Os povos primitivos já haviam percebido que algumas plantas possuíam, em suas bases, princípios ativos que ao serem testados no combate às enfermidades revelaram na prática seu poder de cura. Durante muito tempo, o uso de plantas medicinais foi artifício terapêutico principal empregado para cuidar da saúde das pessoas e de suas famílias.

Com o desenvolvimento ocorrido no meio técnico-científico, principalmente na área das ciências da saúde, novos procedimentos de tratar e curar as doenças foram originando-se. Uma dessas maneiras compreende o uso de medicamentos industrializados, que são progressivamente introduzidos na rotina da sociedade moderna, através de campanhas publicitárias que prometem curar as mais diversas doenças. Desde então, o uso de plantas medicinais tem sido substituído pelos medicamentos alopáticos (BADKE et al., 2011).

Os consumidores têm ficado cada vez mais exigentes com a qualidade dos produtos que consomem, buscando produtos de origem natural que sejam seguros menos tóxicos e mais eficazes, por tanto, nas últimas décadas, foram intensificados os estudos sobre fitoterápicos que possam proporcionar terapias alternativas (PACKER; LUZ, 2007; WHO, 2013).

Tem-se verificado uma tendência mundial no aumento da demanda por plantas e preparações de origem vegetal como recurso terapêutico, influenciado por fatores econômicos, sociais e culturais. Levando em consideração essa realidade, foi criado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, instituído em 2008, que visa "garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional". Visando a atingir o objetivo desse programa, dentre as proposições, destaca-se a de "Promover e reconhecer as práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais, fitoterápicos e remédios caseiros" (BRASIL, 2008).

Há uma crescente procura por medicamentos e formulação cosmética que contém extratos vegetais, sendo assim, faz-se necessário o estudo das formulações e do vegetal utilizado nesta composição para que sejam produzidos os fitocosméticos e os medicamentos fitoterápicos reconhecidamente eficazes. (FENNER et al., 2006).

Platonia insignis Mart. é uma espécie considerada, na agroindústria, com um grande potencial socioeconômico por seus frutos serem apreciados no mercado e pela possibilidade de serem aproveitados para consumo *in natura* (fruta fresca) e na produção de poupa, sorvetes e derivados. O óleo das sementes do bacuri é utilizado como matéria prima para produção de sabão, para o tratamento de várias doenças de pele e para a manipulação de remédios cicatrizantes para ferimentos de animais (LIMA, 2007). Pesquisas têm demonstrado interesse crescente sobre *Platonia insignis* e suas partes, na intenção de comprovar seus efeitos biológicos.

Nesse sentido, o crescente uso popular de *Platonia insignis* despertou um grande interesse no desenvolvimento dessa pesquisa, que tem como objetivo principal avaliar a atividade biológica de produtos manipulados e do extrato hidroalcoólico obtidos a partir das folhas de *Platonia insignis* (Bacuri) e o potencial antimicrobiano empregando ensaios microbiológicos padronizados para a realização dos testes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família Clusiaceae

O Bacuri pertence à família botânica Clusiaceae, subfamília Clusioideae e ao gênero *Platonia*, que é um monotipo, engloba aproximadamente 1000 espécies subordinadas a 47 gêneros, dispersos em regiões tropicais, subtropicais e temperadas no mundo. Em nove desses gêneros, cerca de 90 espécies são de plantas envolvendo árvores, arbustos, lianas e ervas de interesse econômico pela produção de frutos comestíveis, madeiras nobres, derivados químicos de interesse farmacêutico e industrial (BRUMMIT, 1992; JOLY, 1993; YAACOB e TINDALL, 1995; BARROSO et al., 2002).

No Brasil, entre as espécies frutíferas nativas da Amazônia Brasileira, são descritas cinco representantes dessa família, sendo o bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) a mais importante, do ponto de vista econômico. As outras pertencem ao gênero *Rheediae* são conhecidas como ‘bacuri-mirim’ (*R. gardneriana* Miers. ex. Pl. et. Tr.), ‘bacuripari liso’ (*R. brasiliensis* (Mart.) Pl.et.Tr.), ‘bacurizinho’ (*R. acuminata* (R. et. P.) Pl. et. Tr.) e ‘bacuripari’ (*R. macrophylla* (Mart.) Pl. et. Tr.), essas espécies detêm nomenclatura vulgar em referência à espécie mais conhecida ‘bacurizeiro’ (*Platonia insignis* Mart.), todas possuem porte e frutos menores, de qualidade inferior que o bacurizeiro (LIMA, 2007).

As principais classes de compostos encontrados na família Clusiaceae são xantonas, cumarinas, biflavonoides e benzofenonas, produzidos pelas plantas principalmente como mecanismo de defesa. As benzofenonas das plantas da família Clusiaceae possuem propriedades incluindo anti-inflamatórios, antimicrobianos, e efeitos citotóxicos (ACUÑA et al., 2009).

2.2 Gênero *Platonia*

Platonia insignis tem sido considerado como a única espécie do gênero *Platonia*, mais conhecida como bacurizeiro. As sementes são aproveitadas na fabricação do óleo de bacuri, esse óleo é popularmente utilizado no tratamento de doenças de pele e como cicatrizante de ferimentos em animais. Esse gênero é descrito como muito rico em substâncias naturais como xantonas (euxantonas), ácidos graxos, e triglicerídeos (CLEMENT e VENTURIERI, 1990; CAVALCANTE, 1996).

Os frutos do Bacuri são bastante consumidos no norte do Brasil. A ocorrência de bacurizeiros na região norte do País abrangendo os estados do Pará, Maranhão e Piauí, os frutos possuem valor para agroindústrias e exportação de polpa (no país e no exterior), gerando renda, emprego e uma nova alternativa econômica (LIMA, 2007).

Bacuri é o nome popular dado à *Platoniainsignis*. O nome genérico “*Platonia*” é uma homenagem ao filósofo grego Platão e “*insignis*” o nome da espécie, significa notável, insigne, importante, grande, aquele que é notório, em alusão ao porte do fruto (YAMAGUCHI, 2014).

A investigação dos extratos e compostos de *P. insignis* são baseadas no uso popular. Estudos farmacológicos já realizados com essa planta apontam fonte promissora para elaboração de possíveis fitomedicamentos com atividade cicatrizante, anti-inflamatória, anticonvulsivante, antimicrobiana, citotóxica e antioxidante e diversas doenças como câncer, Alzheimer e Parkinson (SANTOS JUNIOR et al., 2010).

2.3 Atividade antioxidante

Tem-se verificado um grande interesse no estudo de antioxidantes, especialmente pelas descobertas sobre o efeito deletério dos radicais livres e agente oxidantes no organismo. Além de instáveis os radicais livres são moléculas muito reativas que podem acarretar muitas doenças como câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e diabetes mellitus tipo I (NASCIMENTO et al., 2011; RAMOS et al., 2011).

Durante o metabolismo celular ou exposição a fatores exógenos ocorrem ações catalíticas de enzimas que produzem radicais livres no organismo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Esses radicais livres produzidos em grandes quantidades podem gerar o estresse oxidativo, causando um desequilíbrio entre o sistema pró-oxidante e antioxidantes (NASCIMENTO et al., 2011).

O uso de antioxidantes naturais como os compostos fenólicos presentes nas plantas tem sido associado a uma menor ocorrência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, pois atuam inibindo a formação de radicais livres (MORAIS et al., 2009).

O importante papel dos antioxidantes no combate aos danos provocados pelos radicais livres tem conduzido ao desenvolvimento de grande número de métodos para determinar a capacidade antioxidante de variadas substâncias. Dentre os inúmeros métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* ou *in vivo*, um dos mais utilizados é o DPPH,

método colorimétrico baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (RUFINO et al., 2007).

Uma das características do método de sequestro do radical DPPH é que não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação, podendo reagir com compostos fenólicos, sendo muito utilizado para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas, o mesmo possui coloração púrpura. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R.), o DPPH é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada por espectrofotometria. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou porcentagem de sequestro de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (DARONCHO et al., 2012)

Há uma crescente busca por antioxidantes naturais que substituam ou reduzam o uso dos antioxidantes sintéticos, pois os antioxidantes sintéticos apresentam efeitos colaterais prejudiciais à saúde. A descoberta do efeito deletério dos radicais livres sobre as células agindo como causador ou agravante de doenças impulsiona a busca por novas substâncias antioxidantes (ALVES, 2010). É possível que os compostos fenólicos presentes em extratos das folhas de *Platonia insignis* possam ser uma importante fonte de compostos antioxidantes.

2.4 Atividade antimicrobiana de produtos naturais

Os produtos naturais têm sido utilizados por milhares de anos para fins de medicina popular. Os extratos de plantas têm grande potencial no tratamento de doenças infecciosas causadas por microrganismos resistentes, destacando-se a presença de flavonoides que agem sobre as células bacterianas rompendo a membrana citoplasmática e inibindo a atividade enzimática. A associação de antibióticos com extratos de plantas contra microrganismos resistentes representa novas escolhas para o tratamento de doenças infecciosas. Esse efeito permite a utilização do antibiótico quando já não é mais eficiente sozinho durante o tratamento terapêutico (NASCIMENTO et al., 2000; OZAN, 2007).

Baseado no uso popular, estudos utilizando ferramentas analíticas modernas possibilitam realizar buscas detalhadas da constituição química das plantas, esses resultados viabilizam novos parâmetros ao estudo farmacológico e microbiológico, com o possível desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (SOMERA, 2015). Nesse sentido, há diversos caminhos para o estudo de plantas medicinais.

As plantas medicinais são fontes acessíveis de cuidados de saúde primários para cerca de 80% da população de países em desenvolvimento, por ser uma fonte acessível de cuidados primários com a saúde, especialmente pela ausência de acesso a medicina moderna. Estima-se que, 50% das drogas ocidentais apresentam fitoconstituintes vegetais ou derivados sintéticos de fitoconstituintes, medicamentos comercialmente comprovados usados nas práticas modernas foram inicialmente usadas em várias formas tradicionais ou práticas de cura popular na forma bruta (PARAAKH e RAVICHANDRA, 2016).

2.5 Resistência microbiana

A Resistência a antimicrobianos (AMR) surge quando os microrganismos que causam infecção sobrevivem à exposição a um medicamento que normalmente é capaz de matar ou paralisar seu crescimento, permitindo que cepas capazes de sobreviver à exposição desse medicamento específico possam crescer e se espalhar. Isso levou ao surgimento de "superbactérias", como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e bactéria causadora da tuberculose extremamente resistente a medicamentos, bactérias que são difíceis ou impossíveis de tratar com medicamentos existentes (O'NEILL, 2016).

O combate à resistência bacteriana é um problema de saúde pública mundial e deve ser abordado sob vários aspectos. O entendimento dos processos relacionados à ação de antibióticos e ao surgimento da resistência, o planejamento, a síntese e avaliação farmacológica de novos agentes antimicrobianos mais potentes, sua posterior aplicação terapêutica de forma racional e a adoção de normas para controle de infecções no meio hospitalar representam diferentes níveis de ações contínuas e interligadas. Fármacos com novos mecanismos de ação deverão apresentar vantagens no combate a micro-organismos resistentes e à emergência de novos patógenos (GUIMARAES, 2010; SILVEIRA, 2006).

Estima-se que até 2050 as mortes causadas pela resistência aos antimicrobianos podem chegar a 10 milhões por ano, com um custo cumulativo para a produção econômica global de 100 trilhões de dólares segundo um relatório da ONU sobre as perspectivas da população mundial (ONU, 2015).

Após a Segunda Guerra Mundial, houve um fluxo constante de novos antibióticos no mercado, do final da década de 1940 até o início da década de 1970. Essa taxa de descoberta caiu drasticamente desde a década de 1980 (PAYNE, 2007). Os investimentos em fundos de capital de risco no Desenvolvimento e Inovação Farmacêutico (D & I) entre 2003 e

2013 foram de 38 bilhões de USD, desse total apenas 1,8 bilhão de dólares foram investidos em pesquisa de antimicrobiano (RENEWICK, 2016).

O desenvolvimento de fármacos eficientes no combate a infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas. Por outro lado, a disseminação do uso de antibióticos lamentavelmente fez com que as bactérias também desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos, desenvolvendo maior resistência (WALSH, 2000).

O fenômeno da resistência bacteriana a diversos antibióticos e agentes quimioterápicos impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública. Esta resistência prolifera-se rapidamente através de transferência genética, atingindo algumas das principais bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (RANG, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Analisar o perfil fitoquímico, atividade biológica do extrato das folhas de *Platonia insignis* Mart. e desenvolver formulações farmacêuticas com atividade antimicrobiana.

3.2 Específicos

- Verificar o perfil fitoquímico do extrato bruto hidroetanólico a partir das folhas de *Platonia insignis* Mart.;
- Verificar informações estruturais do extrato bruto e das frações hexânica e acetato de etila através de LC-MS e FIA-ESI-IT/MSⁿ;
- Determinar potencial antioxidante do extrato das folhas de *Platonia insignis* em diferentes concentrações;
- Elaborar bioprodutos manipulados do extrato das folhas de *Platonia insignis* com atividade antimicrobiana;
- Determinar a atividade antibacteriana através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato bruto, das frações e dos bioprodutos;
- Verificar a atividade hemolítica do extrato das folhas de *Platonia insignis*;
- Verificar a toxicidade do extrato das folhas de *Platonia insignis* frente *Artemia salina*.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta e identificação do material botânico

As folhas da espécie vegetal selecionada foram coletadas manualmente na área urbana do município de São Luís, Maranhão – Brasil. A coleta foi realizada no mês de outubro de 2015 entre 6:00 e 7:00 da manhã. Uma amostra da planta foi encaminhada ao Herbário Ático Seabra da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para ser identificada e catalogada sob o número de registro 01084.

4.2 Obtenção do extrato hidroetanólico

As folhas foram coletadas e limpas manualmente, foram secas em temperatura ambiente. Posteriormente as folhas secas foram trituradas e pesadas, obtendo-se 112g de material vegetal. Em seguida, este material triturado e pesado foi adicionado a 336 mL da mistura hidroetanólica (70% de etanol 1:4 m/v) deixando macerar em frasco rosqueado, ao abrigo de luz a temperatura ambiente por três dias com renovação do solvente a cada 24 horas e agitação ocasional segundo a metodologia proposta por Matos (2009).

A solução extrativa foi filtrada a vácuo usando funil de Buchner, o filtrado foi evaporado em um evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura controlada a 40°C. O material concentrado foi levado ao freezer, adequadamente vedado e mantido até ser liofilizado para posterior utilização nos testes. O extrato foi obtido no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) do Departamento de Química (DEQUI) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

4.3 Fracionamento por partição líquido-líquido

O extrato liofilizado das folhas de *Platonia insignis* Mart., foi utilizado para obtenção das frações hexânica e acetato de etila pelo processo de partição líquido-líquido. Para obtenção das frações, utilizou-se 4g de extrato liofilizado suspenso em 70mL de uma solução de água e metanol (8:2), primeiramente submetida a partição líquido-líquido por quatro vezes com hexano. A fase hexânica foi separada da fase hidrometanólica por meio de um processo de decantação e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida e

posteriormente liofilizada. Subsequentemente, a fase hidrometanólica foi submetida à extração líquido-líquido por quatro vezes com acetato de etila seguindo o procedimento anterior. A fase hidroalcoólica remanescente obtida após a extração, foi concentrada em evaporador rotativo e liofilizada. Todas as frações obtidas foram encaminhadas para realização de testes (MENSOR, 2001).

4.4 Screening fitoquímico

O extrato hidroetanólico (70% de etanol) foi submetido à triagem fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários através de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado, característico para cada classe de substâncias. Para identificar o grupo de esteroides e triterpenos foi utilizado reação de Liebermann-Buchard; na classe dos fenóis e taninos foi utilizada a reação com solução alcoólica de cloreto férrico; as classes de flavonóides, cumarinas, leucoantocianianidinas, catequinas, flavonóis, xantonas e flavononas foram identificadas utilizando-se da mudança de pH. A presença das classes de metabólitos secundários foi classificada como: fortemente positivo (+++), positivo (++) , fracamente positivo (+) ou ausente (-) segundo metodologia descrita por Matos (2009).

Os testes foram realizados no Laboratório de Fitoquímica e Fitoterapia do Departamento de Farmácia (DEFAR) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

4.4.1 Teste para Fenóis e Taninos

Em um tubo de ensaio, colocou-se 3-4 mL do extrato hidroalcoólico; foi adicionado 3 gotas de solução alcoólica de cloreto férrico. Agitou-se bem e observou-se qualquer variação de cor ou formação de precipitado. A mudança de coloração sem precipitação será positiva para fenóis; desenvolvimento de precipitado escuro de tonalidade azul indicará presença de taninos hidrolisáveis e formação de precipitado escuro de tonalidade verde será positivo para taninos condensados.

4.4.2 Teste para Flavonoides

Foram utilizados 3 tubos de ensaio numerados de 1 a 3 com 4 mL de extrato em cada tubo. O tubo 1, foi acidulado com solução ácida (4 gotas de HCL 1 mol/L) pH 3, o tubo 2

foi alcalinizado a pH 8,5 (20 gotas de hidróxido de sódio) e o tubo 3 alcalinizado a pH 11 (24 gotas de base). Observou-se qualquer mudança de coloração.

4.4.3 Teste para Cumarinas

Com auxílio de um tubo capilar, foram feitas duas fortes manchas com o extrato de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro, em um pedaço de papel de filtro não fluorescente. Aplicou-se sobre uma das manchas uma gota de solução alcoólica de 1mol/L de hidróxido de potássio (KOH). Cobriram-se parcialmente as manchas com um cartão opaco não fluorescente e foram expostas o conjunto à ação da luz UV por cerca de 2-3 minutos. Descobriu-se a parte encoberta ainda sob a luz UV e, observou-se se houve modificação na fluorescência da mancha que foi alcalinizada. Desenvolvimento de fluorescência esverdeada progressiva e forte, bem visível na metade não encoberta da mancha alcalinizada indicará a presença de cumarinas.

4.4.4 Teste para Alcaloides

Dissolveu-se o resíduo seco do extrato em 20 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,1 mol/L, e aquecido por 2 minutos. Filtrou-se e resfriou-se o filtrado que foi dividido em 3 tubos de ensaio. Foi gotejado os reativos específicos de Mayer, Hager e Dragendorff. Observar a formação de precipitado.

4.4.5 Teste para Triterpenos e Esteroides

Foi extraído o resíduo seco do extrato em 10 mL de clorofórmio, tendo o cuidado de triturar bem o resíduo com o solvente. Filtrou-se a solução clorofórmica, gota a gota, em funil fechado com algodão coberto com alguns decigramas de sulfato de sódio anidro, para um tubo de ensaio limpo e seco. Foi adicionado 1 mL de anidrido acético, agitou-se suavemente, e adicionou-se 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Agitou-se novamente e foi observado o desenvolvimento de cor. Coloração azul seguida de verde permanente será positiva para esteroides livres; coloração parda até vermelha indicará a presença de triterpenos livres.

4.4.6 Teste para Saponinas

A partir do resíduo seco insolúvel em clorofórmio do teste anterior, o mesmo foi dissolvido em 10 mL de água destilada, sendo filtrada a solução em um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente o tubo com a solução por 3 minutos com a finalidade de observar a formação ou não de espuma. Espuma persistente e abundante indicará a presença de saponinas.

4.5 Caracterização por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrometria de Massas (LC-ESI-IT-MS).

4.5.1 Extração em fase sólida

O extrato bruto, as frações hexânica e acetato de etila obtidas a partir das folhas de *P. insignis*, passaram por uma extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Phenomenex Strata C18 (500 mg de fase estacionária) que foram previamente ativados com 5 mL de MeOH e equilibrados com 5 mL de MeOH: H₂O (1: 1, v/ v). Os compostos foram eluídos a partir de cartuchos utilizando 1 mL de MeOH: H₂O (1: 1, v/ v) com um volume final de 5 mL. A amostra foi então filtrada através de um filtro PTFE de 0,22 µm e secas. O extrato seco foi diluído para 10 µg/mL em solvente grau massas e analisado (LANÇAS, 2004).

4.5.2 Análises de LC-MS

As amostras foram analisadas por LC-MS em um espectrômetro de massas LCQ Fleet, Thermo Scientific® em parceria com o Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais do IB-CLP/UNESP. A separação por HPLC foi realizada utilizando coluna cromatográfica Kinetex® C18 100 Å com poros de 5µm, e dimensões de 4,6 x 100 mm. A fase móvel utilizada consistiu em água, ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila mais ácido fórmico 0,1% (B), acrescentadas de ácido fórmico 0,1%, em gradiente exploratório, iniciando com 10% a 100% de B em 10 minutos, em um fluxo de 1,0 mL/min.

Os espectros de massas foram obtidos no espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Scientific®, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi ionizada por electrospray (ESI) e as fragmentações foram obtidas em múltiplos estágios (MSⁿ), em uma interface do tipo *ion-*

trap (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise de todos os espectros. As condições experimentais foram: voltagem do capilar -35 V, voltagem do spray -5000 V, temperatura do capilar a 350°C, gás de arraste (N₂) e fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi de m/z 100-1000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectro (ROCHA et al., 2014 com adaptações).

4.5.3 Análise por FIA-ESI-IT-MS

A infusão de fluxo direto da amostra foi realizada num analisador do tipo Ion trap da Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI), em modo negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Utilizou-se um tubo capilar de aço inoxidável a 280 °C, uma tensão de pulverização de 5,00 kV, uma tensão capilar de 90 V, uma lente de tubo de -100 V e um fluxo de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$. A análise completa de varrimento foi registada na gama m/z de 100-1000. As fragmentações em estádios múltiplos (ESI-MSⁿ) foram realizadas utilizando o método de dissociação induzida por colisão (CID) contra hélio para ativação de íons. O primeiro evento foi um espectro de massa de varredura completa para adquirir dados sobre íons nessa faixa m / z . O segundo evento de varredura foi uma experiência MS/MS realizada utilizando uma varredura dependente de dados nas moléculas [M-H] dos compostos de interesse com uma energia de colisão de 30% e um tempo de ativação de 30ms. Os íons de produto foram então submetidos a uma maior fragmentação nas mesmas condições, até não serem observados mais fragmentos. A identificação dos diferentes compostos do extrato hidroalcoólico foi feita comparando com a literatura seus tempos de retenção, espectros no UV e fragmentos obtidos na Espectrometria de Massas espectro (ROCHA et al., 2014 com adaptações).

Estes estudos visam primordialmente elucidar os constituintes do metabolismo secundário da amostra vegetal, por meio da caracterização do extrato bruto e das frações, principalmente as que apresentaram melhores resultados nos testes biológicos. A primeira etapa de preparo dos extratos das folhas de *Platonia insignis* foi realizada no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

4.6 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi analisada através do sistema de redução do radical DPPH. A solução estoque foi preparada na concentração de 60 μM em MeOH com absorbância inicial de aproximadamente $0,62 \pm 0,02$ ($\lambda = 517 \text{ nm}$), a temperatura ambiente.

O extrato foi solubilizado em MeOH na concentração inicial de 20000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a partir dessa concentração foram feitas sucessivas diluições de acordo com a reatividade da amostra. As concentrações variaram de 250 a 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A mistura reacional na cubeta foi composta pela adição de 1950 μL da solução do radical DPPH em 50 μL da amostra diluída em várias concentrações de modo a se obter uma curva de inibição. No teste com o branco as amostras foram substituídas por metanol.

A absorbância foi medida no primeiro minuto da reação ($t = 1$), e nos primeiros 20 min de reação monitorada a cada 5 min. Após os 20 min iniciais foram feitas leituras em intervalos contínuos de 10 min. O ponto final da reação foi determinado quando a absorbância se manteve constante (SILVA, 2010).

A porcentagem de inibição dos radicais DPPH \bullet (I_{DPPH}) para cada amostra foi calculada de acordo com a equação (equação 1).

Equação 1 – Porcentagem de inibição do radical DPPH

$$I_{\text{DPPH}} \% = \left[1 - \left(\frac{\text{AbsA}}{\text{AbsB}} \right) \right] \times 100$$

Onde:

AbsA e AbsB são as absorbâncias da amostra e do controle (branco) no término da reação respectivamente.

A atividade de sequestro do DPPH \bullet também foi expressa por meio da concentração mínima efetiva para reduzir a 50% da concentração inicial. Os valores da CE_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram obtidos por regressão linear ($P < 0,05$) utilizando os valores de concentração das amostras versus a inibição.

4.7 Manipulação dos bioprodutos

Os bioprodutos foram manipulados de acordo com as fórmulas contidas no Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2012) para as bases de creme aniônico II (Lanette[®]), sabonete íntimo e solução para uso tópico, com adaptações (tabela 1).

O processo de obtenção das formulações farmacêuticas obtidas a partir do extrato das folhas de *P. insignis* teve a patente requerida pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob o Nº BR 10 2017 001529 7 (Anexo A).

Tabela 1 – Formulações desenvolvidas a partir do extrato hidroetanólico (70%): solução tópica, creme e sabonete íntimo.

Solução tópica 1 e 5%	Creme 1 e 5%	Sabonete íntimo 1 e 5%
Glicerina 15%	Glicerina 5%	Lauril éter sulfato de sódio 34%
Propilenoglicol 15%	Água destilada q.s.p.	Dietanolamina de ácido graxo de coco 1,5%
Alcool etílico 10%	álcool cetosteárilico e cetilesteáril sulfato de sódio (9:1) 5%	Cocoamidopropilbetaina 5%
Extrato 1% (10mg/mL) e 5% (50mg/mL)	Óleo mineral 3%	Hidroxietilcelulose 0,5%
Água destilada q.s.p.	Cetiol 2,5%	Propilenoglicol 2%
	Extrato 1% (10mg/mL) e 5% (50mg/mL)	Cloreto de sódio q.s.
		Ácido láctico q.s.
		Extrato 1% (10mg/mL) e 5% (50mg/mL)
		Água destilada q.s.p.

Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

As formulações foram preparadas para obtenção de 100 mL, o sabonete íntimo teve seu pH ajustado para 4,5 com ácido láctico, não foi necessário ajuste do pH para as formulações de solução tópica e creme. Todas as formulações foram desenvolvidas com a ausência de conservantes normalmente utilizados na constituição dos excipientes.

4.8 Análise de estabilidade e controle de qualidade das formulações farmacêuticas

Foram realizados testes em conformidade com o Guia de Estabilidade para Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004) e Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos (BRASIL, 2008), seguindo as normas preconizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

4.9 Teste de centrifugação

As amostras das formulações foram submetidas ao teste de estabilidade pelo método de centrifugação onde pesou 10g do produto sólido e medido um volume de 10 mL dos produtos líquidos adicionados em tubos de ensaio cônico graduado e submetidos à rotação de 3.000 rpm (Fanem[®], Excelsa Baby I) durante 30 minutos.

4.10 Avaliações organolépticas

As amostras foram visualmente observadas quanto às alterações de odor, homogeneidade e cor, em duas etapas, uma no dia da elaboração das fórmulas e 30 dias após o acondicionamento nas temperaturas $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Geladeira), $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ (temperatura ambiente) e $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ (em estufa).

4.11 Determinação de pH

Para a determinação do pH as amostras foram preparadas da seguinte maneira: Após elaboração da fórmula, utilizou-se o pH-metro para verificar o pH da formulação, após obter o resultado verificou se estava adequado, caso houvesse necessidade de correção, adicionar ácido láctico na formulação em agitação leve e verificar novamente no pH-metro até obter um pH adequado, no Tempo zero (T0) e após o acondicionamento por 30 dias nas temperaturas $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Geladeira), $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ (temperatura ambiente) e $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ (em estufa). A amostra para esta análise foram coletadas diretamente das formulações preparadas.

4.12 Determinação de viscosidade

A viscosidade foi determinada utilizando o viscosímetro rotativo microprocessado (Quimis®, Q860M21), esta técnica permite medir eletronicamente a força de torção já convertida em viscosidade. A análise foi avaliada 30 dias após o acondicionamento em temperatura ambiente, utilizando o Spindle (rotor 4) em rotação de 30 rpm e 23,6°C na porcentagem de leitura em 50% (desempenho ótimo do fio de torção espiral) sendo a faixa de leitura recomendada para anotar o valor de mPa.s (mili pascal por segundo).

4.13 Controle de qualidade microbiológico das formulações

O Controle de qualidade microbiológico foi avaliado no Tempo Zero (T0), ou seja, uma semana após formulados, pela Técnica de Tubos Múltiplos seguindo a metodologia preconizada pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) e os limites estabelecidos pela Resolução RDC nº 481/99 (BRASIL, 1999) que estabelecem os parâmetros para o controle microbiológico de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Os produtos foram diluídos na proporção 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em solução NaCl 0.89% e posteriormente retirou-se 1.000µL de cada diluição e adicionou-se em tubos contendo 9 mL de caldo Lauryl (Merck®), caldo Verde brilhante (Coliformes totais) (Himedia®) e caldo *Escherichia coli* (caldo EC) (Coliformes termotolerantes) (Himedia®) respectivamente.

Para a contagem de microrganismos heterotróficos foi realizada a técnica de Plaqueamento em Profundidade (“Pour Plate”), sendo inoculado 1.000µL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em meio PCA (Plate Count Agar) (Himedia®).

Para a verificação de crescimento fúngico foi utilizada a técnica de Plaqueamento em Superfície (“Spread Plate”), onde foi inoculado 100µL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em meio Sabouraud (Merck®) e posterior espalhamento com alça de Dringalski na superfície do meio. As placas de PCA foram encubadas em estufa bacteriológica 35°C 24 horas e as placas Sabouraud por até 48 horas.

Os tubos contendo caldo Verde brilhante foram incubados em banho-maria SI 150 (Solab®) temperatura controlada de 37°C por 24 horas, os tubos contendo caldo EC incubados em banho-maria a 44,5°C 24 horas e posterior leitura com 48horas. Os tubos contendo caldo Lauyl foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 24horas. A

positividade do teste é considerada pela presença de turvação e formação de bolhas (gás) dentro do tubo de Durham presente no interior do tubo contendo o meio.

4.14 Atividade antimicrobiana: extrato bruto, frações e formulações

4.14.1 Seleção das cepas bacterianas

As amostras bacterianas são oriundas do Laboratório de Microbiologia Clínica – Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão. Para realização dos testes foram utilizados microrganismos padrão (ATCC - American Type Culture Collection) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 e isolados clínicos de *Staphylococcus haemolyticus* e *Salmonella spp.* escolhidos a partir dos resultados obtidos no teste de triagem.

4.14.2 Preparo das suspensões microbianas

Os microrganismos serão inicialmente reativados a partir das suas culturas originais e mantidos em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) a 35°C por 24h. Posteriormente, as amostras serão cultivadas em placas de Ágar Nutriente a 35°C por 24 horas. Colônias isoladas serão então ressuspendidas em 3mL de solução fisiológica (NaCl 0.9 %) esterilizada até atingir uma turbidez equivalente na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) (CLSI, 2013).

4.15 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM será feita através da técnica de microdiluição segundo a metodologia da diluição em caldo proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). As placas de 96 poços estéreis serão preparadas com 150µL de caldo BHI e 150µL do produto a ser testado seguido de diluições seriadas, cada inóculo de bactéria será transferido para os poços e levados à estufa a 35°C por 24 horas, após o período de incubação será adicionado o revelador de crescimento microbiano resazurina a 0,1% e realizada a leitura após 4 horas de incubação (Palomino et al., 2002; Araújo; Longo, 2016; Estevam et al., 2016). A CIM será a menor concentração da solução onde não houve crescimento bacteriano visível.

4.16 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Serão utilizadas as placas incubadas para determinação da CIM em meio líquido para determinação da CBM. Uma alçada de cada poço será inoculada em placas de Ágar Müeller Hinton e posteriormente incubadas em ambiente à 35°C por 24h. As CBM's serão consideradas para a menor concentração da solução onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9% de morte microbiana).

4.17 Avaliação da atividade hemolítica do extrato das folhas de *P. insignis*

4.17.1 Isolamento das hemácias (Preparo da suspensão de hemácias):

O sangue de carneiro foi centrifugado a 3000 rpm por um período de 15 minutos, posteriormente o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente, as hemácias foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) por 3 vezes e centrifugadas a 3000rpm por 15 minutos a cada lavagem, para retirada de traços de plasma e de outras impurezas. Após o processo de lavagem, as hemácias foram ressuspensas em PBS suplementado com 10mmol/L de glicose na concentração de 8×10^9 cél./mL. A solução foi conservada a 4°C (WOLFGANG et al., 1987).

4.17.2 Avaliação da IC₅₀ (50% de inibição de atividade hemolítica):

O extrato de *P. insignis* foi preparado na concentração de 100 mg/mL (extrato/PBS), posteriormente foram realizadas diluições seriadas em 6 tubos contendo 1mL de PBS (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32). Após a diluição, foi adicionado 25µL da suspensão de hemácias em 975µL de cada uma das diluições, seguido de homogeneização. Incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Logo após, o período de incubação, as diluições foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 1 minuto, o sobrenadante foi decantado em cubeta de 1cm sendo medida a absorbância no comprimento de onda de 540nm contra o branco (substância-teste diluída em PBS). Os resultados foram comparados com o tubo totalmente lisado pela água destilada que foi utilizada como controle positivo (WOLFGANG et al., 1987).

4.17.3 Hemólise

A partir dos dados obtidos no estudo da IC_{50} , foram elaboradas as curvas dose-resposta referente ao extrato em estudo nas concentrações do extrato utilizado. As diluições hemolisadas, foram incubadas com 25 μ L da suspensão de hemácias em PBS por 10 minutos a temperatura ambiente com agitação constante. Após 10 minutos, foram centrifugadas a aproximadamente 10.000 rpm durante 1 minuto e o grau de hemólise foi determinado no sobrenadante com a leitura a 540nm contra o branco. As leituras obtidas foram comparadas com a leitura do tubo totalmente lisado pela água destilada, de forma a calcular a concentração efetiva que causa 50% de hemólise (H_{50}). O teste foi realizado em triplicata (WOLFGANG et al., 1987).

4.17.4 Desnaturação:

Foi prepara uma solução mãe do extrato de *P. insignis* em PBS na concentração de 10mg/mL, foi adicionado 975 μ L da solução mãe em tubos, foi adicionado 25 μ L de suspensão de eritrócitos e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente em agitação constante. Após 10 minutos, foram centrifugadas a aproximadamente 10.000 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi decantado em cubeta de 1cm. Posteriormente, mediu-se a absorbância nos comprimentos de onda de 540 e 575nm contra o branco (extrato de *P. insignis* diluído em PBS). A absorbância medida a 575nm (α) foi dividida pela absorbância medida a 540nm (β), obtendo assim a proporção α/β . Esta proporção foi usada para caracterizar o Índice de desnaturação da hemoglobina (ID) (WOLFGANG et al., 1987). Equação para obtenção do Índice de Desnaturação (ID):

$$ID(\%) = (R_1 - R_i) / (R_1 - R_2) \times 100, \text{ onde:}$$

R_1 - proporção α/β da hemoglobina;

R_i - proporção α/β da substância-teste;

R_2 - proporção α/β do SDS a 0,1%.

4.18 Toxicidade frente às larvas de *Artemia salina* Leach

O teste de toxicidade frente as larvas *Artemia salina* foi realizado segundo a metodologia estabelecida por Meyer (1982) adaptada por Ruiz et al., (2005). Onde os cistos de *A. salina* foram obtidos comercialmente foram eclodidos nas condições descritas pela

metodologia preconizada. Após eclosão e maturação até chegar a metanúplio, aplicou-se o teste utilizando diferentes concentrações para calcular a DL_{50} , e classificar o nível de toxicidade da substância testada. Os dados foram analisados através do método de Probit (FINNEY, 1962).

4.18.1 Cultura das larvas de *Artemia salina* Leach

Em um aquário, contendo 1L de solução salina sintética (60g de sal marinho/litro água destilada), será adicionado aproximadamente 80 mg dos ovos de *A. salina*. Mantendo esse sistema saturado de gás oxigênio, por meio de aeração constante e temperatura controlada de 25°C, através do auxílio de bomba de ar. Além disso, o aquário será iluminado artificialmente por uma lâmpada de 100 W por 24-48h até que os ovos eclodam. Espera-se que as larvas (náuplios) migrem em direção à região mais iluminada por apresentarem fototropismo positivo. Em seguida, serão transferidas para um béquer contendo solução salina sintética e mantidas em incubação por mais 24h, sob as mesmas condições de iluminação e oxigenação, para que as larvas se desenvolvam para o estágio de metanúplio.

4.18.2 Preparo da amostra e determinação do valor da DL_{50}

Para a avaliação da letalidade de *A. salina*, 20 mg do extrato serão adicionados a 20 μ L de DMSO, completando-se o volume para 2 mL com salina artificial. Essa diluição será feita para obtenção de uma solução mãe de 10.000 μ g/mL e com uma concentração de 0,01% de DMSO. Amostras de 5, 50, 125, 250 e 500 μ L dessa solução mãe serão transferidas para frascos com 5 mL de solução final, obtendo-se concentrações de 10, 100, 250, 500 e 1000 μ g/mL, respectivamente. Dez larvas na fase metanúplio serão transferidas para cada um dos frascos. O controle negativo será 2 mL de salina sintética e 20 μ L de DMSO, enquanto o controle positivo será realizado com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Após 24 horas de incubação, será realizada a contagem das larvas vivas, considerando-se mortos aqueles microcrustáceos que não se movimentarem durante a observação e nem com a leve agitação do frasco. Os testes serão realizados em triplicata. A DL_{50} será estimada a partir da regressão linear obtida da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração do extrato a ser utilizado (CARVALHO et al., 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Rendimento do extrato

112g de folhas secas e moídas renderam 11g de extrato liofilizado, apresentando rendimento de 9,82%. A partir de 4g do extrato liofilizado para obtenção das frações calculou-se o rendimento: hexânica 6,55% (0,262g) e acetato de etila 36,17% (1,447g).

Calculou-se o rendimento total dos extratos, de acordo com a fórmula 1:

Formula 1 – Calculo de rendimento de extrato

$$Re = \frac{P_{ext}}{P_{folhas}} \times 100$$

Onde: Re = Rendimento total do extrato (%); P_{ext} = Peso do extrato seco (g); P_{folhas} = Peso das folhas frescas ou secas (g) (Rodrigues *et al.*, 2011).

Os dados mostram maior rendimento para a fração acetato de etila. O extrato liofilizado apresentou um rendimento relativamente baixo quando comparado com rendimento obtido com a fração acetato de etila. Seriam necessários cerca de 10 quilos de folhas para obtenção de 1 quilo de extrato liofilizado e 2,857 quilos de extrato liofilizado para fornecer 1 quilo de fração acetato de etila.

5.2 Triagem fitoquímica

A análise fitoquímica fornece informações relevantes acerca da presença de metabólitos secundários nas plantas, para que assim possa chegar ao isolamento de princípios ativos importantes na produção de novos fitoterápicos. Os resultados são classificados em: Negativo (-), Positivo (+), Moderadamente positivo (++) e Fortemente positivo (+++). A análise fitoquímica do extrato mostrou a presença de Fenóis, Taninos condensados, Catequinas, Esteroides, Alcaloides, classificados como fortemente positivos e Flavononóis e Saponinas, classificados como moderadamente positivo, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 2 - Avaliação qualitativa e semi-quantitativa dos constituintes químicos no extrato hidroetanólico das folhas de *Platonia insignis* Mart.

Cumarinas	-
Fenóis	+++
Taninos hidrolisáveis	-
Taninos condensados	+++
Antocianidinas e antocianinas	-
Flavonas, flavonóis e xantonas	-
Chalconas e auronas	-
Flavanonóis	++
Leucoantocianidinas	-
Catequinas	+++
Flavononas	-
Triterpenoides	-
Esteroides	+++
Saponinas	++
Alcaloides	+++

Resultados expressos como média dos ensaios de avaliação qualitativa e semi-quantitativa de constituintes químicos realizados em triplicata no extrato hidroalcoólico. Fortemente positivo = (+++); Moderadamente Positivo = (++); Positivo = (+); Negativo = (-). Fonte: Elaborado pelo autor (2017)

Os compostos fenólicos presentes no extrato como: Taninos condensados, Catequinas, Flavononóis, estão vastamente distribuídos no reino vegetal, são constituídos por pelo menos um anel aromático cujo hidrogênio é substituído por uma hidroxila e estão associados a diversas atividades biológicas (SIMÕES et al, 2004).

Dentre os compostos fenólicos, tem-se em abundância no extrato do bacuri, os flavonoides, estes são compostos bioativos, presente na dieta dos seres humanos, provenientes de fonte vegetal e que exibem inúmeras propriedades biológicas, bem como a capacidade de modular numerosas enzimas, ação anti-inflamatória, promoção da vasodilatação, ação hormonal (especificamente as isoflavonas) e significativa atividade antioxidante (DOVICH; LAJOLO, 2011).

Os alcaloides também foram encontrados como sendo um dos compostos majoritários do extrato do bacuri. Os alcaloides são conhecidos por suas atividades antimaláricas, antimicrobianas e citotóxicas (OLOYEDE et al., 2010).

As saponinas são substâncias relacionadas com o sistema de defesa das plantas e derivam do metabolismo secundário, normalmente são encontradas nos tecidos mais suscetíveis ao ataque de fungos, bactérias ou insetos (WINA et al., 2005). As saponinas

podem se ligar com os esteroides e formar complexos que frequentemente apresentam ação hipocolesterolemia e antifúngica de ação sobre membranas celulares, alternando sua permeabilidade (SIMÕES et al., 2004).

Alguns dos constituintes químicos do extrato das folhas de *P. insignis* (Bacuri) foram identificados nesse estudo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (LC-ESI-IT-MS (tabela 3).

Tabela 3 – Compostos identificados por LC-MS e FIA-ESI-IT-MS do extrato de *Platonia insignis*.

Amostra	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ⁿ fragmentos	Compostos
Extrato	191	173;111	Ácido Quínico
	283		Ácido oleico
	279		Ácido linoleico
	301	330,255	Miricetina
	447	429;419;325;269	Orientina
	583	285; 255	Kaempferol-3-o-rutinosídeo
	447	300; 255	Quercetina-3-Arabinosídeo
	301	284	Quercetin
	429	401; 295	Ononin
	555	431	Fukugentina
Fração Hexânica	301	300, 255	Miricetina
	283		Ácido oleico
	279		Ácido linoleico
Fração Acetato	429	401; 295	Ononin
	431	295; 269	Vitexina
	447	429;419;325;269	Orientina
	555	429;299	Fukugentina
	317	285	Miricetina
	329	314	Cirsiliol
	301	284	Quercetina
	573	447	NI
	777	659;651; 447	NI
	717	591; 565; 429	NI
	761	634; 608; 431	NI
	1111	985;679; 428	NI
	1113	555; 429	Dimero de Fukugentina
	1275	718; 718; 555; 429	NI

[M-H]⁻ (m/z): Massa por carga de íons; MSⁿ: Espectrometria da Massas de cada fragmento; NI: Fragmento Não Identificado. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2017).

No extrato bruto de *P. insignis* foram identificados o kaempferol-3-o-rutinosídeo (**d**) e quercetina-3-arabinosídeo (**e**), os glicosídeos de kaempferol e quercetina foram analisados por Ho et al., (2017) apresentando forte estimulação da absorção de glicose e ácido oleico *in vitro*, podendo desempenhar um papel importante no controle da hiperglicemia.

Na fração hexânica do extrato de *P. insignis* foram identificados o ácido oleico (**b**), ácido linoleico (**a**), esses ácidos graxos são descritos por Bentes et al., (1986) como constituintes do óleo das sementes de Bacuri. De acordo com Santos Junior et al., (2010), os ácidos graxos presentes no óleo extraído dos frutos do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) favorecem o processo de cicatrização de feridas cutâneas.

Na fração hexânica também foi identificado o flavonoide miricetina (**c**). Hassan et al. (2017) utilizou a miricetina como protetor de nefrotoxicidade induzida por cisplatina (antineoplásico), os estudos indicaram que este flavonoide atuou significativamente a supressão da deteriorização e do estresse oxidativo renal em murinos.

Dentre os compostos presentes na fração acetato de etila no extrato de *P. insignis* foi identificado fukugentina (**l**) (ou morelloflavona) e um dímero de fukugentina. Esses resultados corroboram com os dados descritos na literatura por Ferreira et al., (2012), que descreveu a ocorrência de 40 biflavonoides isolados de diferentes espécies de vegetais da família Clusiaceae. A morelloflavona é o representante mais frequente dentre as espécies investigadas. Este grupo de metabólito secundário é empregado como marcador quimiosistemático de Clusiaceae, em especial da subfamília Clusioideae.

A ampla distribuição e diversificação estrutural observada para estes compostos de natureza dimérica em Clusiaceae permitiram não apenas ressaltar a sua relevância em estudos quimiosistemáticos, como também assegurar a importância medicinal destas plantas, considerando-se que este grupo de metabólitos tem apresentado importantes propriedades farmacológicas. (Ferreira et al., 2012 p. 2276).

Os compostos fenólicos como o ononin (ou glucósido de formononetina) (**g**), vitexina (**h**), orientina (lutexina) (**i**), miricetina (**j**), quercetina (**m**), foram as substâncias mais identificadas neste trabalho, correspondendo aos achados nas revisões de literatura realizadas por Yamaguchi et al., (2014) e por Santos et al., (2013) sobre *P. insignis*. Os flavonoides apresentam atividade sobre permeabilidade capilar, antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antitumoral e hormonal.

5.3 Substâncias identificadas no extrato das folhas de *Platonia insignis* Mart.

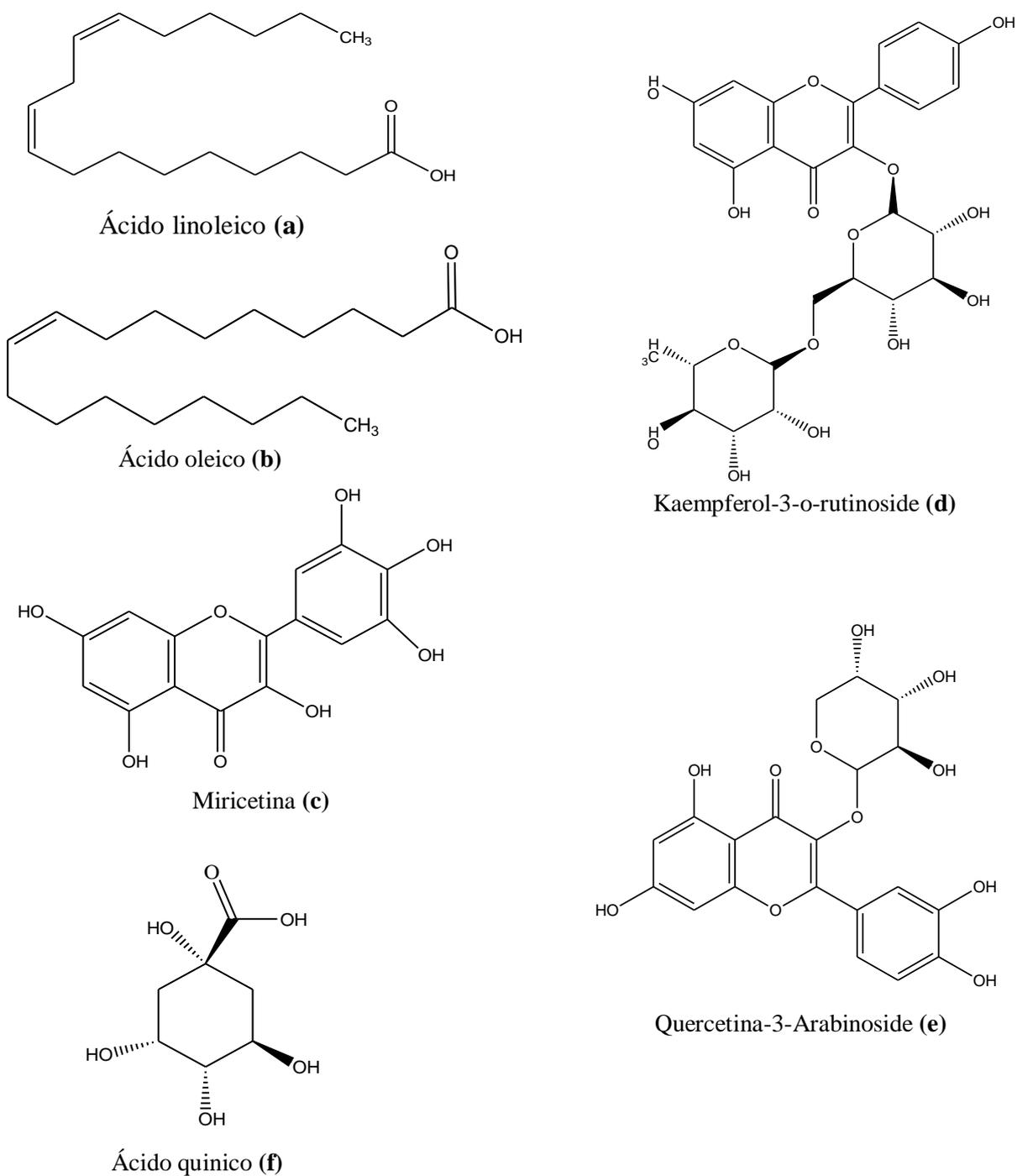


Figura 1 – Constituintes químicos identificados na fração hexânica (a), (b) e (c) e os constituintes identificados no extrato bruto de *Platonia insignis* Mart (d), (e) e (f).

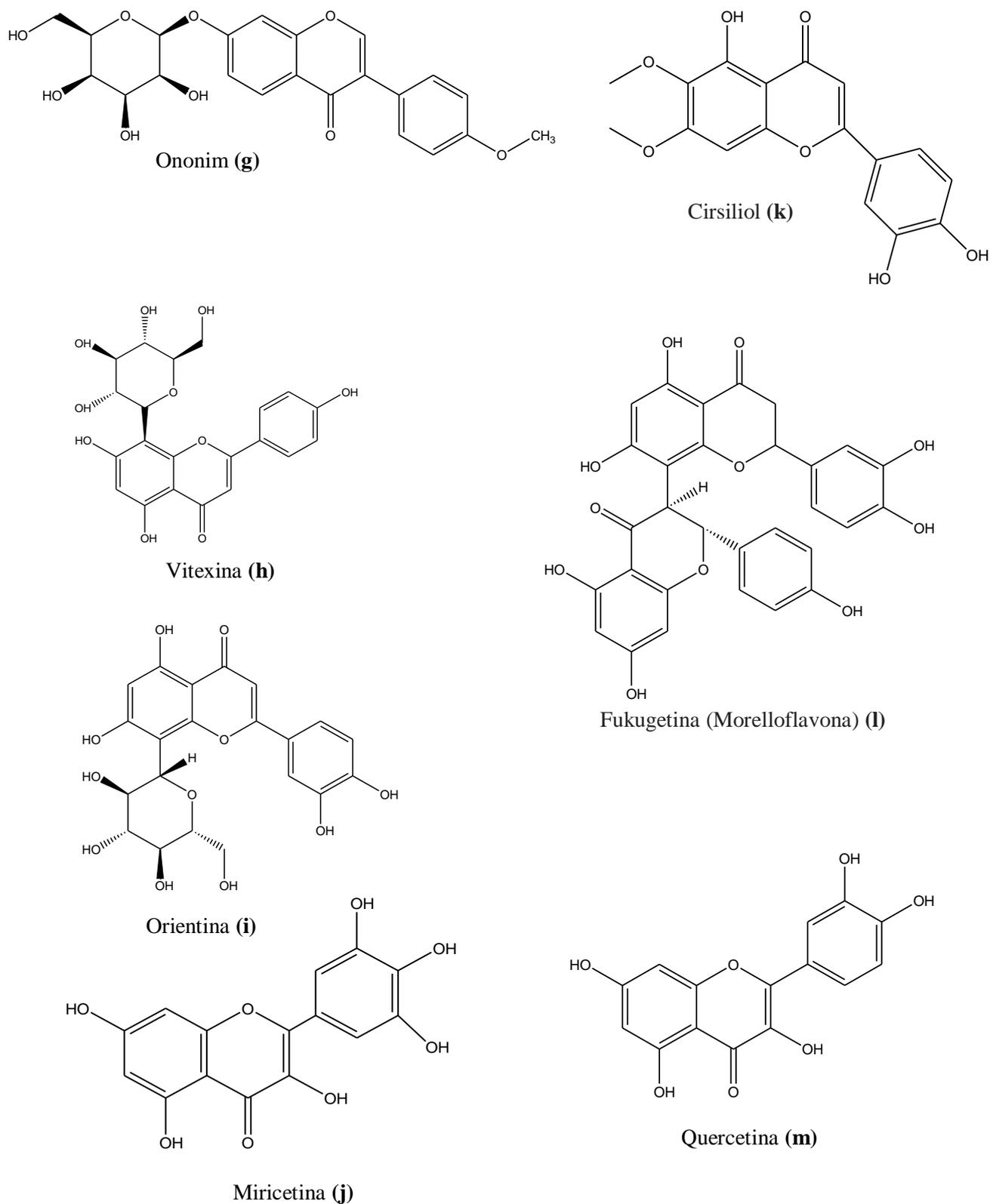


Figura 2 – Constituintes químicos identificados na fração acetato de etila de *P. isnignis* (g), (h), (i), (j), (k), (l) e (m).

5.4 Atividade antioxidante do extrato a partir das folhas de *P. insignis*

Os resultados obtidos após a determinação da atividade antioxidante do extrato das folhas de *Platonia insignis* em diferentes concentrações estão representados na Tabela 4. Os resultados demonstram que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente ao aumentar a concentração de extrato adicionada, atingindo o valor máximo de $88,06 \pm 0,27\%$ de atividade antioxidante para a concentração de $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 4 - Dados de Atividade Antioxidante (%) do extrato das folhas de *Platonia insignis*.

Concen- tração em $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Atividade Antioxidante (%)**					
	Tempo (min)					
	1	5	10	15	20	30
250	12,90±2,13 ^{aA}	14,26±0,92 ^{aAB}	15,19±0,84 ^{aABC}	16,74±2,17 ^{aBC}	17,29±2,15 ^{aBC}	18,06±0,41 ^{aC}
500	20,80±0,28 ^{ba}	24,46±0,41 ^{bb}	27,71±0,38 ^{bc}	29,98±1,61 ^{bCD}	31,68±1,79 ^{bDE}	32,80±0,50 ^{bE}
1000	28,85±0,89 ^{ca}	34,82±1,15 ^{cb}	39,22±0,10 ^{cc}	42,84±1,37 ^{cd}	45,32±1,27 ^{ce}	47,74±0,36 ^{cf}
2000	35,06±0,54 ^{da}	51,23±0,12 ^{db}	60,40±1,10 ^{dc}	66,91±0,84 ^{dd}	70,70±0,74 ^{de}	76,07±0,21 ^{df}
4000	37,60±0,90 ^{ea}	64,14±0,65 ^{eb}	75,19±0,38 ^{ec}	81,91±0,34 ^{ed}	84,98±0,09 ^{ee}	88,06±0,27 ^{ef}

** Valores médios \pm desvio padrão (n=3).

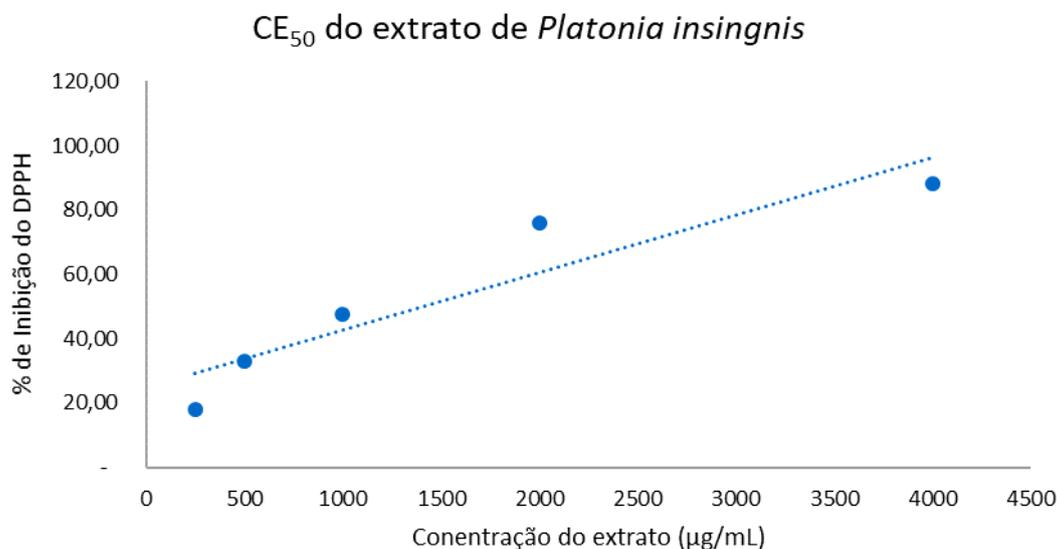
* Letras minúsculas iguais na vertical não diferem significativamente quanto à concentração pelo teste de Tukey, com 95% de significância.

* Letras maiúsculas iguais na horizontal não diferem significativamente quanto ao tempo pelo teste de Tukey, com 95% de significância.

A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de extrato utilizada apresentou a equação da reta ($Y = 0.0178x + 24.912$), com uma alta correlação dose-resposta ($R^2 = 0.8651$, $p < 0,0201$) fornecendo um CE_{50} de $1409 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que é a concentração de extrato necessária para atingir 50% de atividade, Figura 3.

O extrato do bacuri apresenta em sua constituição compostos fenólicos como taninos, flavonoides e catequinas. Os fenóis e polifenóis, possuem uma alta ação antioxidante (Simões, et al., 2004), essas substâncias antioxidantes atuam minimizando danos pelas espécies reativas de oxigênio no organismo.

Figura 3 – Atividade antioxidante (%) por inibição do DPPH do extrato de *Platonia insingnis*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2017)

Lins et al., (2016) analisaram a atividade antioxidante do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Vismia guianensis* onde o extrato bruto apresentou capacidade de inibição do DPPH com CE₅₀ de 6,76 µg.mL⁻¹ e *Clusia paralicola* pertencente à família Clusiaceae que apresentou CE₅₀ de 44,0 µg.mL⁻¹, a melhor CE₅₀ de inibição do DPPH foi para o flavonoide isolado vitexina CE₅₀ de 9,02 µg.mL⁻¹, dentre as frações a melhor CE₅₀ foi de 37,7 µg.mL⁻¹. Esses extratos apresentaram alto teor de fenólicos, indicando que os fenólicos contidos nestas fases podem ser responsáveis pela inibição dos radicais livres.

A atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH para o extrato etanólico das folhas de *G. brasiliensis* apresentou CE₅₀ de 23,81 µg.mL, o melhor resultado de CE₅₀ neste trabalho foi para o extrato das sementes com CE₅₀ de 23,10 (seguido pelo das folhas), esses resultados foram melhores que o apresentado pelo antioxidante padrão BHT (CE₅₀ de 70,11 µg.mL) (NAVES, 2014).

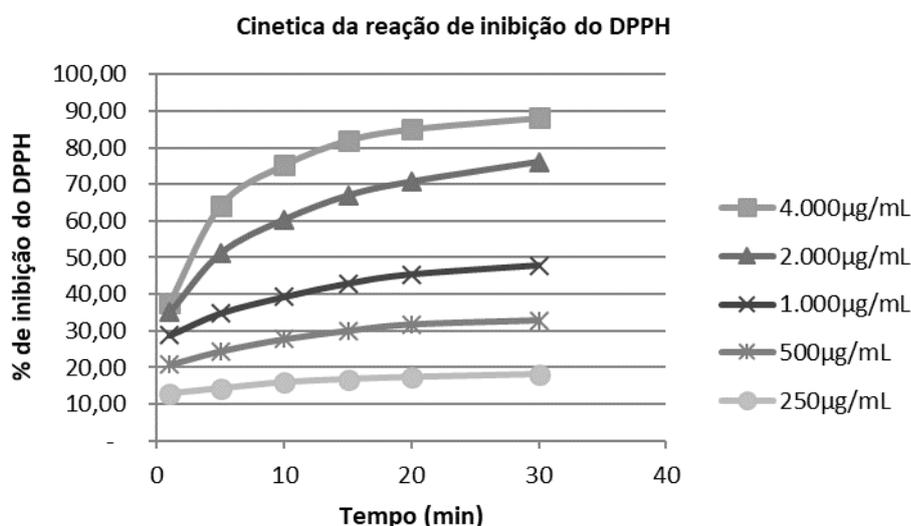
Em um estudo realizado por Vieira et al., (2011) ao analisar a atividade antioxidante da polpa de frutas tropicais como acerola (*Malpighia glabra* L.), goiaba (*Psidium Guayaba* L.), abacaxi (*Ananas comosus* L.), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), bacuri (*Platonia insingnis*) e graviola (*Annona muricata* L.), foi constatado a menor atividade antioxidante para a polpa do bacuri e também valores mais baixos de compostos fenólicos comparada a poupa das outras frutas utilizadas no estudo.

Costa Junior et al., (2011), sugerem que a fração acetato de etila do extrato das sementes de *P. insignis* confere atividade antioxidante e anticonvulsivante no Sistema Nervoso Central (SNC) induzidas por pilocarpina em roedores, onde o extrato atuou contra a peroxidação lipídica e produção de nitrito, além de aumentar as atividades de enzimas antioxidantes. A geração de espécies reativas de oxigênio é um dos processos pelo qual a atividade epiléptica exerce seus efeitos deletérios sobre o cérebro. A fração acetato de etila atuou diminuindo a frequência de convulsões e aumentou a taxa de sobrevivência dos animais em teste.

De acordo com Costa Junior et al., (2013), as frações de acetato de etila e diclorometano do extrato etanólico de semente de *P. insignis* apresentam atividades antioxidantes *in vitro*, medidas por testes ABTS e DPPH, e efeito protetor *in vivo* contra a citotoxicidade induzida por H₂O₂ em cepas de *S. cerevisiae*. O efeito antioxidante pode ser atribuído aos polifenóis presentes nessas frações, bem como à presença de alfa e gama-mangostina.

No gráfico 4, podem ser visualizadas as curvas cinéticas de degradação do radical DPPH nas diferentes concentrações do extrato das folhas de *Platonia insignis* em função do tempo de reação. O extrato das folhas de *Platonia insignis* apresentou forte capacidade antioxidante nos primeiros 10 minutos de reação e expressiva redução do radical DPPH nos últimos 10 minutos durante os 30 minutos de reação.

Figura 4 – Cinética da reação de inibição do DPPH (%) do extrato de *Platonia insingnis*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2017)

O extrato das folhas de *P. insignis* apresenta uma cinética de reação intermediária, pois finalizam a reação de inibição do radical DPPH durante os 30 minutos de reação.

Segundo Brand-Williams, Cuvelier, Berset (1995), três tipos de comportamento cinético podem ser observados em compostos com atividade antioxidante: quando o composto reage rapidamente com o DPPH, atingindo um nível constante em menos de um minuto (cinética rápida), comportamento intermediário chegando ao final da reação após aproximadamente 5 e 30 minutos (cinética intermediária) e comportamento lento que podem levar de 1 até 6 horas para atingir um estado estacionário (cinética lenta).

5.5 Análise de estabilidade das formulações farmacêuticas

Após o teste de centrifugação, todas as formulações mantiveram suas características iniciais, sem quaisquer alterações ou mudança de fase.

“O estudo da estabilidade de produtos cosméticos fornece informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas variadas condições a que possa estar sujeito desde sua fabricação até o término de sua validade” (BRASIL, 2004, p. 11).

O sabonete íntimo obtido a partir das folhas de *Platonia insignis* tanto a 1% quanto a 5% quando submetidos ao armazenamento em diferentes condições de temperatura apresentaram variação do pH, pode-se observar que houve um aumento do pH na formulação de sabonete a 1%, onde, no T0 apresentou pH 4,5 que é o pH desejável para esta formulação, após 30 dias o sabonete íntimo teve um aumento do pH para 5,0 e para 6,0 quando submetidos a temperatura de geladeira $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ e em estufa $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ respectivamente. Quanto às características organolépticas o sabonete permaneceu inalterado, como demonstram os resultados na tabela 5.

Tabela 5 – Avaliação organoléptica e determinação de pH no T0 (tempo zero) e após 30 dias da formulação do **sabonete íntimo** de *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) a 1 e a 5% submetida a diferentes condições de armazenamento.

	Após elaboração (T0)	Após acondicionamento por 30 dias.		
Temperatura (°C)	21±2°C (ambiente)	21±2°C(ambiente)	5±2°C (geladeira)	37±2°C (estufa)
pH da formulação a 1%	4,5	5,0	6,0	6,0
pH da formulação a 5%	4,5	4,5	5,0	5,5
Características organolépticas 1%	Líquido homogêneo, com odor característico, coloração marrom claro, límpido.	Líquido homogêneo, com odor característico, coloração marrom claro, límpido.	Líquido homogêneo, com odor característico, coloração marrom claro, límpido.	Líquido homogêneo, com odor característico, coloração marrom claro, límpido.
Características organolépticas 5%	Líquido homogêneo, com odor característico, coloração marrom, límpido.	Líquido homogêneo, com odor característico, coloração marrom, límpido.	Líquido homogêneo, com odor característico, coloração marrom, límpido.	Líquido homogêneo, com odor característico, coloração marrom, límpido.

T0: Tempo zero (primeiras 24h de formulado); **Fonte:** Elaborado pelo autor (2017).

Os resultados avaliados no período de 30 dias demonstraram que a relação entre as condições de temperatura interfere diretamente no pH das formulações. O pH do sabonete íntimo apresentou um aumento significativo no pH 4,5 a 6,0 quando submetidos a variação de temperatura, o pH deve ficar em torno de 4 para a região íntima feminina.

Após o teste de estabilidade preliminar por centrifugação, o creme aniônico foi submetido a testes de estabilidade onde foram avaliados o pH e as características organolépticas (cor, odor, aspecto). O creme obtido a partir das folhas de *Platonia insignis* a 1% e a 5% apresentaram pH 5,0 como sendo um valor desejável para esta formulação no T0 e 30 dias após armazenamento em temperatura ambiente, as amostras submetidos a temperatura de geladeira 5±2°C pH 5,0 e estufa 37±2°C pH 5,5 permanecendo assim com o pH desejável para a formulação. Quanto às características organolépticas o creme permaneceu inalterado, como demonstram os resultados na tabela 6.

Tabela 6 – Avaliação organoléptica e determinação de pH no T0 (tempo zero) e após 30 dias da formulação do **creme** de *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) a 1 e a 5% submetida a diferentes condições de armazenamento.

	Após elaboração (T0)	Após acondicionamento por 30 dias.		
		21±2°C (ambiente)	5±2°C (geladeira)	37±2°C (estufa)
Temperatura (°C)	21±2°C (ambiente)	21±2°C(ambiente)	5±2°C (geladeira)	37±2°C (estufa)
pH da formulação a 1%	5,0	5,0	5,0	5,5
pH da formulação a 5%	5,0	5,0	5,0	5,5
Características organolépticas 1%	Cremoso (emulsionado), com odor característico, coloração marrom esverdeado.	Cremoso (emulsionado), com odor característico, coloração marrom esverdeado.	Cremoso (emulsionado), com odor característico, coloração marrom esverdeado.	Cremoso (emulsionado), com odor característico, coloração marrom esverdeado.
Características organolépticas 5%	Cremoso (emulsionado), com odor característico, coloração esverdeada.			

T0: Tempo zero (primeiras 24h de formulado); **Fonte:** Elaborado pelo autor (2017).

Os cremes manipulados apresentaram pH entre 5,0 e 5,5, alteração de pH dessas formulações foi baixa e apesar desse resultado, o pH dos cremes encontram-se compatíveis com o pH de formulações para uso cutâneo.

Após o teste de estabilidade preliminar por centrifugação, a solução tópica foi submetida a testes de estabilidade onde foram avaliados o pH e as características organolépticas (cor, odor, aspecto). A solução obtida a partir das folhas de *Platonia insignis* a 1% e a 5% apresentaram pH 5,0 como sendo um valor desejável para esta formulação no T0, houve uma diminuição do pH 30 dias após armazenamento em temperatura ambiente na formulação a 1% (pH 5,0 para 4,0) e a 5% (pH 5,0 para 4,5) que foi a mesma variação para as formulações a 1% em temperatura de geladeira 5±2°C. Quando submetidas a temperatura de estufa 37±2°C 30 dias após armazenamento o pH foi 4,5. Para a solução a 5% quando submetida a temperatura de geladeira 5±2°C o pH diminuiu de 5,0 para 4,5 e pH 5,0 após 30 dias quando armazenada em estufa 37±2°C. Quanto às características organolépticas o creme permaneceu inalterado como demonstram os resultados na tabela 7.

Tabela 7 – Avaliação organoléptica e determinação de pH no T0 (tempo zero) e após 30 dias da formulação da **solução tópica** de *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) a 1 e a 5% submetida a diferentes condições de armazenamento.

	Após elaboração (T0)	Após acondicionamento por 30 dias.		
		21±2°C (ambiente)	5±2°C (geladeira)	37±2°C (estufa)
Temperatura (°C)	21±2°C (ambiente)	21±2°C (ambiente)	5±2°C (geladeira)	37±2°C (estufa)
pH da formulação a 1%	5,0	4,0	4,0	4,5
pH da formulação a 5%	5,0	4,5	4,5	5,0
Características organolépticas 1%	Líquido, homogêneo, com odor característico, coloração marrom.			
Características organolépticas 5%	Líquido, homogêneo, com odor característico, coloração marrom.			

T0: Tempo zero (primeiras 24h de formulado); **Fonte:** Elaborado pelo autor (2017).

Nas formulações para solução tópica com pH variando entre 4,0 e 5,0. Mesmo sendo compatíveis com o pH cutâneo, a variação de pH pode ser um dos fatores que indiquem instabilidades futuras (LEONARDI, 2005).

Três aspectos da formulação relacionadas ao pH devem ser compatíveis: estabilidade dos ingredientes da formulação, eficácia e segurança do produto, para que não ocasione uma incompatibilidade química.

Segundo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos temperaturas elevadas aceleram reações físico-químicas e químicas, ocasionando alterações em: atividade de componentes, viscosidade, aspecto, cor e odor do produto. Baixas temperaturas aceleram possíveis alterações físicas como turvação, precipitação, cristalização (BRASIL, 2004, p. 12).

Os testes devem ser conduzidos sob condições que permitam fornecer informações sobre a estabilidade do produto em menos tempo possível. Para isso, amostras devem ser armazenadas em condições que acelerem mudanças passíveis de ocorrer durante o prazo de validade. Deve-se estar atento para essas condições não serem tão extremas pois, a finalidade é acelerar o envelhecimento e não provocar alterações que não ocorreriam no mercado. Segundo o Guia de estabilidade de Produtos Cosméticos modificações dentro de limites determinados podem não configurar motivo para reprovar o produto (BRASIL, 2004).

A formulação de sabonete íntimo não possui boa estabilidade quando submetida a temperaturas $5^{\circ}\text{C} < T < 37^{\circ}\text{C}$ quando avaliado o pH. O creme não apresentou grandes oscilações de pH que o fizessem perder suas características quando submetido a temperatura maior que 37°C , nas outras concentrações não houve alteração. A solução tópica apresentou diminuição do pH após 30 dias e nas condições de temperatura testadas.

5.5.1 Determinação da viscosidade

A viscosidade do sabonete íntimo foi avaliada utilizando-se um viscosímetro rotativo, a leitura foi realizada 30 dias após a manipulação. Foi avaliada a formulação acondicionada em temperatura ambiente ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), a unidade de medida utilizada é o mili pascal segundo (mPa.s). A base do sabonete líquido apresentou 1.000 mPa.s, o sabonete a 1% apresentou 1.000 mPa.s e o sabonete a 5% apresentou viscosidade de 1.500 mPa.s.

A viscosidade adequada para xampus e sabonetes líquidos, quando medido em viscosímetro rotacional tenha pelo menos 1.000 mPa.s na maioria dos xampus e sabonetes líquidos comerciais a viscosidade se situa entre 1.000 e 5.000 mPa.s, para uma boa aceitação pelo consumidor (FERREIRA, 2010).

5.5.2 Controle de Qualidade Microbiológico das formulações

Foram avaliados os padrões de qualidade microbiológicos do extrato, das bases e das seis formulações farmacêuticas elaboradas neste trabalho: Sabonete íntimo a 1% e a 5%, Creme a 1% e a 5%, Solução de uso tópico a 1% e a 5%, observando-se a ausência de contaminantes nas formulações e no extrato de *Platonia insignis*.

A ausência de crescimento microbiano nas amostras pode estar relacionada as boas práticas de manipulação adotadas no preparo das formulações preconizadas pela RDC N° 67/07 que são práticas requeridas para manutenção da integridade do produto e proteção do usuário. Segundo Silva et al., (2014) um dos principais fatores associados à contaminação microbiana de formulações magistrais contendo plantas pode ser devido ao mal tratamento da água, pois é o ambiente que mais proporciona o seu desenvolvimento.

A água utilizada no preparo das formulações foi Água purificada que segundo a Farmacopeia Brasileira é “a água potável que passou por algum tipo de tratamento para retirar os possíveis contaminantes e atender aos requisitos de pureza estabelecidos na monografia” (BRASIL, 2010, p. 39). Os utensílios utilizados na incorporação do extrato nas formulas farmacêuticas juntamente com a água utilizada foram previamente esterilizados em autoclave

por 15 minutos a 121°C. No momento da incorporação do extrato foi utilizado bico de Bunsen para manutenção de condições estéreis. A ausência de crescimento microbiano nas formulações comprova que o controle empregado na manipulação reflete na qualidade microbiológica do produto manipulado e que o extrato atua como conservante das formulações, sem alterar a estabilidade da formulação

A resolução RDC nº 481/99 estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, devido a necessidade de ações de controle de produtos sujeitos à Vigilância Sanitária, visando a proteção do consumidor (BRASIL, 1999). Segundo a RDC nº 481/99 os limites de aceitabilidade de contaminação microbiológica para produtos que entrem em contato com mucosas:

- a) Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios totais, não mais que 10² UFC/g ou mL Limite máximo 5x 10² UFC/g ou mL;
- b) Ausência de *Pseudomonas aeruginosa* em 1g ou mL;
- c) Ausência de *Staphylococcus aureus* em 1g ou mL;
- d) Ausência de Coliformes totais e fecais em 1g ou mL;
- e) Ausência de Clostrídios sulfito redutores em 1 g (exclusivamente para talcos).

Matérias-primas, água e pessoal são fontes importantes de contaminação microbiana e devem ser controlados.

5.6 Atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico (70%) a partir das folhas de *Platonia insignis* Mart. (Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima - CIM e CBM)

O extrato apresentou atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos testados, com CIM entre 1,56 e 6,25 mg/mL e CBM entre 3,12 e 12,5 mg/mL. A menor CIM encontrada foi de 1,56 mg/mL para *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus haemolyticus*, seguido de 3,12mg/mL para *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e 6,25mg/mL para *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella spp.* Para todos os microrganismos testados o extrato apresentou ação bactericida, ou seja, foi capaz de causar morte dos microrganismos, conforme mostra a tabela 9.

Tabela 8 - Atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroetanólico (a 70%) a partir das folhas de *Platonia insignis* Mart. (Bacuri)

Microrganismo	CIM¹	CBM¹	CN²
<i>A. baumannii</i> 12337641	1,56	3,12	-*
<i>S. haemolyticus</i> 13084879	1,56	6,25	-
<i>S. pyogenes</i> 7223181	3,12	3,12	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3,12	6,25	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3,12	12,5	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6,25	6,25	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	6,25	12,5	-
<i>Salmonella spp.</i> 7855729	6,25	12,5	-

(-*) ausência da atividade antimicrobiana; ⁽¹⁾ CIM e CBM do extrato em mg/mL obtido a partir das folhas de *Platonia insignis* Mart. a 50mg/mL Mart; ⁽²⁾ CN – Controle Negativo – álcool a 70%. **Fonte:** Autor (2017).

Embora não exista consenso na literatura sobre valores de referência de concentração inibitória mínima para extratos vegetais, Duarte (2006) sugere alguns critérios para classificar a atividade antimicrobiana de extratos (tabela 10).

Tabela 9 – Classificação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais segundo Duarte (2005).

CIMs DO EXTRATO	RESULTADO
Até 5 mg/ml	inibição alta
Entre 6 e 15 mg/ml	inibição moderada
Acima de 16 mg/ml	inibição baixa

Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

Seguindo esse critério o extrato das folhas de *P. insignis* apresenta uma atividade inibitória de moderada a alta. Extratos vegetais que apresentam atividade antimicrobiana com CIM's muito altas são de difícil aproveitamento farmacêutico no tratamento de infecções bacterianas e antifúngicas (BASTOS, 2016).

Esses resultados demonstram que o extrato hidroetanólico (70%) das folhas de *Platonia insignis* possui atividade antimicrobiana tanto para bactérias gram-positivas quanto gram-negativas. Os microrganismos utilizados neste estudo são de interesse clínico patogênicos a seres humanos difíceis de erradicar devido à sua resistência aos antibióticos. Os altos índices de resistência refletem a tendência epidemiológica atual do crescimento das bactérias com alto padrão de resistência, tornando-se essencial a implementação de medidas de vigilância, isolamento e racionalização do uso de antibióticos a fim de se minimizar a

disseminação destes patógenos (TAKEUCHI, 2005; MARTINS; BARTH, 2013; FRANCO, 2017).

5.7 Atividade antimicrobiana das frações acetato de etila, hexânica e aquosa a partir das folhas de *Platonia insignis* Mart.

Foram testadas as frações hexânica, acetato de etila e aquosa. A fração acetato de etila apresentou atividade antimicrobiana mais efetiva frente aos microrganismos testados com CIM entre 0,78 e 6,25 mg/mL e CBM de 12,5mg/mL. As menores CIM's da fração acetato de etila foram de 0,78 mg/mL para *Pseudomonas aeruginosa*, 1,56 mg/mL para *Staphylococcus haemolyticus*, CIM de 3,12mg/mL para *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* respectivamente e a maior CIM de 6,25 para *Streptococcus pyogenes* e *Salmonella spp.* A fração acetato de etila apresentou CBM de 12,5 mg/mL para todos os microrganismos testados exceto para *Enterococcus faecalis* onde teve ação bacteriostática.

Tabela 10 - Atividade antimicrobiana das frações Hexânica, Acetato de Etila e aquosa obtidas a partir do extrato hidroalcoólico de *Platonia insignis* Mart. (Bacuri).

Microrganismo	Acetato de etila		Hexânica		Aquosa		CN ²
	CIM ¹	CBM ¹	CIM ¹	CBM ¹	CIM ¹	CBM ¹	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,78	12,5	0,78	-	-	-	-*
<i>S. haemolyticus</i> 13084879	1,56	12,5	1,56	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	3,12	-	3,12	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3,12	12,5	1,56	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,12	12,5	3,12	-	-	-	-
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	6,25	12,5	3,12	-	-	-	-
<i>Salmonella spp.</i> 7855729	6,25	12,5	3,12	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	-	-	-	-	-	-	-

(-*) ausência da atividade antimicrobiana; (1) CIM e CBM das frações em mg/mL obtidas a partir de *Platonia insignis* Mart. a 50mg/mL; (2) CN – Controle Negativo – álcool etílico a 70%. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2017).

A fração hexânica apresentou CIM entre 0,78 e 3,12 mg/mL. A menor CIM da fração hexânica foi de 0,78 mg/mL para *Pseudomonas aeruginosa*, 1,56 mg/mL para *Staphylococcus haemolyticus* e *Escherichia coli*, 3,12mg/mL para *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella spp.* e não apresentou ação bactericida. A fração aquosa não apresentou atividade microbiana. Nenhuma das frações apresentou atividade frente *Acinetobacter baumannii*, conforme mostra a tabela 11.

Os melhores resultados de atividade antimicrobiana obtidos pelas frações, são da fração acetato de etila obtida a partir das folhas de *P. insignis*, esse resultado pode ser relacionado com a presença de compostos fenólicos nesta fração. Karling et al., (2017) realizaram um fracionamento líquido-líquido do bagaço de uva e obteve um elevado teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante na fração acetato de etila.

Os resultados obtidos nos ensaios realizados por Melo (2009) comprovaram a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em extratos obtidos com acetato de etila, com CIM de 0,54 mg/mL e 0,85 mg/mL respectivamente, para *Candida albicans* e as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Salmonella entérica* e *Escherichia coli* a CIM variou de 1,0 mg/mL a 2 mg/mL. Para as demais amostras com diferentes solventes utilizadas no teste também foi observado inibição dos micro-organismos que variaram de 0,44 mg/mL a 2 mg/mL, sendo o acetato de etila de modo geral o mais eficiente.

As três frações de *P. insignis* não evidenciaram neste estudo atividade antimicrobiana frente *A. baumannii*, apresentando resultados diferentemente do extrato bruto e das formulações manipuladas (1 e a 5%). Sugere-se que este resultado pode estar relacionado com sinergismo entre os constituintes químicos presentes no extrato bruto e ausente nas diferentes frações de *P. insignis*.

Acinetobacter baumannii é considerado um patógeno oportunista, raramente causa infecções comunitárias. Em geral, acomete pacientes hospitalizados que foram submetidos a procedimentos invasivos, imunodeprimidos (pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida), transplantados e pacientes em uso de antineoplásicos. Os pacientes ficam mais tempo hospitalizados, utilizando antimicrobianos de amplo espectro. O aumento no tempo de internação pode estar associado ao sítio da infecção e ao perfil de suscetibilidade do microrganismo (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; FALAGAS; KARVELI; KELESIDIS, 2007; MAK; KIM; PHAM, 2009).

Um estudo realizado em um hospital terciário estimou a mortalidade associada à bacteremia por *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos (CRAb – carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*) em 34,8%, com o dobro de custos e de tempo de hospitalização associados a essas infecções em comparação ao grupo controle (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008)

5.8 Atividade antimicrobiana dos bioprodutos manipulados a partir do extrato hidroetanólico (70%) das folhas de *Platonia insignis* Mart.

O sabonete íntimo, o creme e a solução tópica manipulados a partir do extrato das folhas de *Platonia insignis* Mart. a 1% apresentaram CIM de 5 mg/mL para *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii*. Todos os produtos testados na concentração de 1% apresentaram concentração bacteriostática (tabela 12).

Tabela 11 - Atividade antimicrobiana do **sabonete íntimo, creme e solução para uso tópico** a 1% manipulados a partir do extrato de *Platonia insignis* Mart. (Bacuri)

Microrganismo	Sabonete 1%		Creme 1%		Solução tópica 1%		CN ²
	CIM ¹	CBM ¹	CIM	CBM	CIM	CBM	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	5	-*	5	-	5	-	-*
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	5	-	5	-	5	-	-
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i> 13084879	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp. 7855729	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-

(-*) ausência da atividade antimicrobiana; (1) CIM e CBM do creme em mg/mL obtidas a partir de *Platonia insignis* Mart. a 1% (10mg/mL); (2) CN – Controle Negativo – base do creme. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2017).

O sabonete íntimo manipulado a 5% a partir do extrato das folhas de *Platonia insignis* Mart. apresentou CIM entre 3,12 e 25 mg/mL. As menores CIM's foram de 3,12 mg/mL para *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Acinetobacter baumannii*, CBM de 12,5 mg/mL para *Enterococcus faecalis* e CBM de 25mg/mL para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Acinetobacter baumannii*. Para os demais microrganismos utilizados no teste o sabonete íntimo apresentou ação bacteriostática.

O creme manipulado a 5% a partir do extrato das folhas de *Platonia insignis* Mart. apresentou CIM entre 1,56 e 25 mg/mL e CBM de 12,5 mg/mL para *Acinetobacter baumannii*. As menores CIM's foram de 1,56 mg/mL para *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*. Para os demais microrganismos utilizados no teste o sabonete íntimo apresentou ação bacteriostática.

A solução para uso tópico manipulada a 5% a partir do extrato das folhas de *Platonia insignis* Mart. apresentou CIM entre 1,56 e 25 mg/mL. As menores CIM's foram de 1,56 mg/mL para *Streptococcus pyogenes* seguido de 3,12 mg/mL para *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*. As CBM's foram de 12,5 mg/mL para *Enterococcus faecalis* e 25 mg/mL para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Acinetobacter baumannii*.

Tabela 12 - Atividade antimicrobiana do **sabonete íntimo, creme e solução para uso tópico** a 5% manipulados a partir do extrato de *Platonia insignis* Mart. (Bacuri)

Microrganismo	Sabonete 5%		Creme 5%		Solução tópica 5%		CN ²
	CIM ¹	CBM ¹	CIM	CBM	CIM	CBM	
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	3,12	-	1,56	-	1,56	-	-*
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,12	-	1,56	-	3,12	25	-
<i>S. haemolyticus</i> 13084879	3,12	-	1,56	-	3,12	25	-
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	3,12	-	12,5	12,5	12,5	25	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	6,25	-	1,56	-	3,12	12,5	-
<i>Salmonella spp.</i> 7855729	12,5	-	25	-	25	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12,5	-	25	-	25	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	25	-	25	-	25	-	-

(-*) ausência da atividade antimicrobiana; (1) CIM e CBM do creme em mg/mL obtidas a partir de *Platonia insignis* Mart. a 5% (50mg/mL); (2) CN – Controle Negativo – base do creme. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2017).

Os bioprodutos manipulados a 1% não apresentaram atividade satisfatória quando comparados com os bioprodutos manipulados a 5% a partir do extrato de *Platonia insignis*. A solução de uso tópico teve uma maior ação inibitória do que o creme e o sabonete, por apresentar concentração em valores mais baixos que as demais capaz de causar a morte de alguns microrganismos. Essa atividade mais efetiva da solução tópica provavelmente está relacionada a melhor difusão das moléculas ativas constituintes do extrato hidroetanólico com os constituintes da base da solução tópica.

No estudo realizado por Migliato et al., (2009), foi avaliado pela técnica de difusão em ágar, o sabonete líquido manipulado de 8% a 20% do extrato glicólico das cascas de *Dimorphandra mollis* Benth (faveiro) com adição de conservante (triclosan) apresentando atividade antimicrobiana já o sabonete manipulado sem conservante, não apresentou ação contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Lopes; Santos e Tomassini (2005) analisaram quatro formulações, contendo extrato etanólico dos frutos de *P. angulata* L. (Camapu) a 25%: sabonete líquido, loção cremosa, desodorante antisséptico e gel de limpeza, as formulações apresentaram atividade bacteriostática pelo ensaio de inibição em placa frente a *S. aureus* ATCC 6538, enquanto a loção cremosa foi ineficaz. Foi realizado o ensaio do coeficiente fenólico modificado, embora mais indicado para produtos desinfetantes, as quatro formulações preparadas foram testadas em comparação ao potencial bacteriostático e bactericida do fenol, o gel e o desodorante apresentaram efeito bactericida.

Somera et al, (2015) sugere que o possível efeito antibacteriano encontrado na avaliação do sabonete líquido contendo 7,5% de extrato glicólico de flores de *T. patula*, frente a cepas de *S. aureus*, é decorrente do sinergismo entre as substâncias polifenólicas (flavonoides, taninos e cumarinas) presentes nas flores da espécie vegetal. No entanto, novos ensaios devem ser realizados para estabelecer a concentração efetiva de extrato que inibe o crescimento bacteriano.

Os resultados encontrados corroboram com a literatura consultada, todos os bioprodutos analisados neste estudo apresentaram atividade antimicrobiana *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, os testes foram realizados utilizando formulações manipuladas sem adição de conservante, a fim de evitar qualquer influência na atividade antimicrobiana das formulações e sofrer interferência exercida pelos conservantes que normalmente são adicionados em produtos manipulados, cosméticos e medicamentos.

5.9 Avaliação da atividade hemolítica do extrato das folhas de *P. insignis*

Os valores de IC_{50} , expressos em mg/ml, representam a concentração do extrato necessária para causar 50% de hemólise (H_{50}) em hemácias saudáveis. O índice de desnaturação (ID) e a razão H_{50}/ID possibilitarão classificar o produto quanto ao seu potencial irritativo. Esses valores, para o extrato, estão descritos na tabela 14.

Tabela 13 - Valores das H_{50} , dos ID e da razão H_{50}/ID do extrato das folhas de *P. insignis* Mart. (Bacuri) e das bases.

Amostra	Experimento	H_{50} mg/ml	ID(%)	H_{50}/ID	Classificação: <i>In vitro</i>
<i>P. insignis</i>	1	>100	N.D	N.D	NI
	2	>100	N.D	N.D	NI
	3	>100	N.D	N.D	NI
Sabonete*	1	>100	N.D	N.D	NI
Creme*	1	>100	N.D	N.D	NI
Sol. Tópica*	1	>100	N.D	N.D	NI

H_{50} - dose efetiva que causa 50% de hemólise; ID - Índice de Desnaturação; N.D - Não determinado; H_{50}/ID - razão utilizada para classificação do potencial de irritação; NI - Não Irritante; *Bases dos bioprodutos.

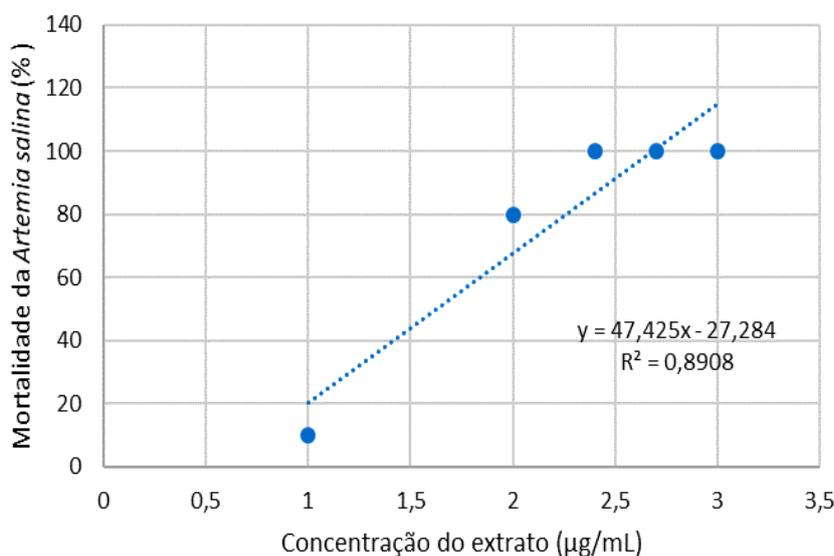
Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Diante dos resultados apresentados, não foi possível determinar o ID (%) e razão H_{50}/ID uma vez que o extrato e as bases mesmo estando em altas concentrações não apresentou atividade hemolítica que provocasse lise em 50% das hemácias. O extrato apresenta saponina em sua composição de acordo com a análise fitoquímica apresentada na tabela 2, alguns tipos de saponinas apresentam atividade hemolítica, a qual faz parte do sistema de proteção dos vegetais contra o ataque de fungos, bactérias, insetos e vírus, estão diretamente ligados a muitas das atividades antifúngica, antibacteriana e espermicida (ARAÚJO; FARIA; SAFADI, 2014). Portanto, as saponinas presentes neste extrato não apresentaram atividade hemolítica nas concentrações testadas. Dessa forma, é possível inferir que será necessária uma concentração maior que 100mg/mL para causar lise nos eritrócitos e, assim, seguindo a classificação apresentada por Wolfgang et al., (1987) o extrato foi enquadrado entre as substâncias não irritantes.

5.10 Atividade toxicidade frente *Artemia salina*

O teste com o extrato de *P. insignis* frente *A. salina* evidenciou a relação de organismos (vivos e mortos) no final do ensaio, dispostos na figura 5. Correlacionando a porcentagem de morte com a concentração do extrato, a regressão linear entre estas variáveis nos permite determinar a DL_{50} de 42,6 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato de *P. insignis*. Foi observado que a mortalidade de 100% das larvas de *A. salina* foi a partir da concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 15). O controle negativo (salina sintética e DMSO) não produziu mortalidade das larvas.

Figura 5 – Porcentagem de larvas de *Artemia salina* mortas em relação às concentrações do extrato de *Platonia insignis*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2017)

Segundo Dolabela (1997), os extratos são classificados com base nos níveis de CL_{50} frente *A. salina*; indicando que extratos com $DL_{50} \leq 80 \mu\text{g/mL}$ são altamente tóxicos, valores de $80 \mu\text{g/mL} < CL_{50} < 250 \mu\text{g/mL}$ são moderadamente tóxicos e $CL_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ indica baixa toxicidade ou são considerados atóxicos. Meyer et al., (1982) consideram a amostra tóxica quando apresentam $DL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ e amostras atóxicas ou inativas as que apresentarem $DL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 14 - Toxicidade do extrato de *P. insignis* frente às larvas de *A. salina*.

Concentração	10	100	250	500	1000
LOG	1	2	2,4	2,7	3
% MORT	10	80	100	100	100

Fonte: Elaborado pelo autor (2017)

Desta forma o extrato de *P. insignis* que possui uma DL_{50} de $42,6 \mu\text{g/mL}$ é considerado altamente tóxico. Segundo Degen et al., (2016) uma infusão das folhas de *P. insignis* apresentou DL_{50} de $3,614 \text{ mg/mL}$ que, foi comparado com os valores de referência da Organização Mundial de Saúde, indicando que o mesmo é atóxico, visto que só são considerados tóxicos valores de DL_{50} abaixo de 1000 mg/mL .

Costa Junior et al., (2013), determinaram a toxicidade às frações acetato de etila ($IC_{50} = 129,0 \mu\text{g/mL}$) e diclorometano ($IC_{50} = 24,89 \mu\text{g/mL}$), obtidas a partir do extrato das sementes de *P. isnignis* frente *A. salina*, essas mesmas frações apresentaram atividade frente a *Leishmania amazonensis* e em ensaios realizado com células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês (V79), os resultados revelaram que ambas as frações são ligeiramente citotóxicas em concentrações até $100 \mu\text{g/mL}$.

De acordo com McLaughlin compostos com $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ no ensaio de letalidade a *A. salina* são considerados bioativos ativos e potencialmente citotóxico contra linhagens de células tumorais, atividade antimicrobiana entre outras (MCLAUGHLIN, 1991), inseticida e anti-*Trypanosoma cruzi* (ALVES et al., 2000).

6 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos conclui-se que:

- A partir da análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico e frações das folhas de *Platonia insignis* foram identificadas substâncias já conhecidas e um importante marcador da família Clusiaceae.
- O extrato apresentou uma importante atividade antioxidante;
- Os testes biológicos demonstraram atividade antimicrobiana do extrato e das formulações farmacêuticas manipuladas a partir das folhas de *P. insignis* frente microrganismos de importância clínica;
- O extrato não apresentou atividade hemolítica detectável nem mesmo em concentrações mais altas que sua dose efetiva, sendo classificado como não irritante;
- O extrato apresentou alta toxicidade frente *Artemia salina* indicando possível biotividade frente células tumorais;
- As formulações farmacêuticas mostraram-se potencialmente viáveis no desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de doenças infecciosas.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA, U. M.; JANCOVSKI, N.; KENNELLY, E. J. Polyisoprenylated benzophenones from Clusiaceae: potential drugs and lead compounds. **Curr Top MedChem** 9: 1560-1580, 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Nikola_Jancovski2/publication/38079906_Polyisoprenylated_Benzophenones_from_Clusiaceae_Potential_Drugs_and_Lead_Compounds/links/00b49530dbe7571bf4000000/Polyisoprenylated-Benzophenones-from-Clusiaceae-Potential-Drugs-and-Lead-Compounds.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2017.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>> Acesso em: 10 jul. 2017.
- ALVES, T. M. de A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, June 2000.
- ANVISA, **Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira**, 2ª edição Rev. 02, 2002.
- ARAÚJO, M. M. de; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de Escherichia coli e Staphylococcus aureus. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 83, 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aib/v83/1808-1657-aib-83-e0702014.pdf>> Acesso em: 02 jun. 2017.
- ARAÚJO, L. L. N.; FARIA, M. J. M. de; SAFADI, G. M. V. V. Prospecção fitoquímica da espécie *Justicia pectoralis* JACQ. VAR. *STENOPHYLLA* LEONARD pertencente à família ACANTHACEAE. **Revista Eletrônica de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia – FaSeM Ciências**. Uruaçu, v.6, n.2, 2014.
- BADKE, M. R. et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**. v.15, n.1, p.132-9, 2011. Universidade Federal do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, Brasil.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de angiospermas no Brasil**. Viçosa, MG: UFV, v. 1. 2. ed., 2002. 309 p.
- BASTOS, I. dos S. **Avaliação da Atividade Antibacteriana, Antifúngica e Antimalárica de extratos, frações e composto obtidos de plantas da região amazônica**. Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) – Universidade Federal da Amazônia, 2016.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995. Disponível em: <<http://ac-els-cdn-com.ez14.periodicos.capes.gov.br/S0023643895800085/1-s2.0-S0023643895800085->

main.pdf?_tid=9862eb9a-6648-11e7-aa89-00000aab0f27&acdnat=1499784944_254c49efcd8b63d3173fda18d2f6a429> Acesso em: 25 jun. 2017.

BRUMMIT, R. K. **Vascular plant families and genera**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. 804 p.

BRASIL. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Portaria Interministerial Nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2ª edição, revista – Brasília: Anvisa, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/material/guia_cosmetico.pdf> Acesso em: 10 jun. 2017.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. -- 1. ed. -- Brasília: ANVISA, 2004. 52 p. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cosmeticos.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2010.

_____. **Resolução RDC nº 481/99 estabelece os parâmetros para o controle microbiológico de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes**. Disponível em: <http://www.prolabnet.com.br/arquivo-rdc/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+481+de+27+de+setembro+de+1999_38996.pdf> Acesso em: 12 jul. 2017. Acesso em: 10 mai. 2017.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário nacional da farmacopeia brasileira**. 5.ed. Farmacopeia Brasileira, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 546p., 1v/il. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf>.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário nacional da farmacopeia brasileira**. 2.ed. Brasília: ANVISA, 2012. 224p. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/2012/FNFB%202_Revisao_2_COFAR_setembro_2012_atual.pdf>. Acesso em: 10 mai. 2017.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6. ed. Belém: CNPq: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1996. f 279.

CARVALHO, C. et al. Cipó-Cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers – Bignoniaceae): Estudo Fitoquímico e Toxicológico envolvendo *Artemia Salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, vol. 6 (1), 51-58, 2009.

CLEMENT, C. R.; VENTURIERI, G. A. *Bacuri and cupuassu*. In: NAGY, S.; SHAW, P. E.; WARDOWSKI, W. G. (Ed.). **Fruits of tropical and subtropical origin: composition, properties and uses**. Lake Alfred: Florida Science Source Inc., 1990. p. 178-192

CLSI, **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013. *Cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. -- 1. ed. -- Brasília: ANVISA, 2004. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cosmeticos.pdf>> Acesso em: 11 jul. 2017.

COSTA JÚNIOR, J. S. et al. Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) on epilepsy models. **Epilepsy & Behavior**, Vol. 22, p. 678-684, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez14.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1525505011005543>> Acesso em: 17 jun. 2017.

COSTA JÚNIOR, J. S. et al. Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart. Seed. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. Vol.112, pp. 34- 41, 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-7843.2012.00924.x/full>> Acesso em: 20 mai. 2017

DARONCHO, M. **Quantificação da Atividade Antioxidante Através de Análises Pelos Métodos DPPH e ABTS**. VI Seminário de Nutrição da UNIFRA. Julho, 2012. Disponível em: <http://www.unifra.br/eventos/seminarionutricao2012/Trabalhos/4392.pdf>. Acesso em 23 Jul 2017.

DEGEN, A. N. et al. **Ensaio toxicológico de infusões das folhas de *Platonia insignis* frente ao microcrustáceo *Artemia salina***. XXIII Salão de Iniciação Científica: Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná - CEULJI/ULBRA, 2016.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H.; An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nat Rev Microbiol**. 2007;5(12):939-51. Disponível em: <http://link-periodicos-capes-gov-br.ez14.periodicos.capes.gov.br/sfxlc141?url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=fi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_ver=Z39.88-2004&rft_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=111072116855000&svc.fulltext=yes> Acesso em: 15 abr. 2017.

DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para a Atividade Antitumoral e anti-T. cruzi de Extratos Vegetais, Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas**. 1997.Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DOVICH, S. S.; LAJOLO, F. M. Flavonoids and their relationship to diseases of the Central Nervous System. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP, v. 36, n. 2, p. 123-135, ago. 2011. Disponível em: <<http://www.revistanutrire.org.br/files/v36n2/v36n2a09.pdf>>. Acesso em: 08 jul. 2017.

DUARTE, M. C. T. **Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil**. Universidade Estadual de Campinas Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas.2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2017.

ESTEVAM, E. B. B. et al. Composição Química e Atividades Biológicas dos Óleos Essenciais das Folhas Frescas de Citrus limonia Osbeck e Citrus latifolia Tanaka (Rutaceae). **Rev. Virtual Quim.** 2016, 8 (6), 1842-1854. Disponível em: <<http://rvq.s bq.org.br/imagebank/pdf/v8n6a06.pdf>> Acesso em: 15 abr. 2017.

FALAGAS, M. E.; KARVELI, E. A.; KELESIDIS, I. et al. Community acquired *Acinetobacter* infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2007; 26(12):857-68.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006

FERREIRA, A. O. Guia Prático da Farmácia Magistral. 4.ed., **rev. e ampl.** v.1. São Paulo: Pharmabooks Editora, 2010.

FERREIRA, R. O. et al. **Ocorrência de biflavonoides em Clusiaceae: aspectos químicos e farmacológicos.** Quim. Nova, Vol. 35, No. 11, 2271-2277, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v35n11/v35n11a35.pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2017.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis.** Cambridge, Cambridge University Press, 1962.

FRANCO, M. M. B. **Etiologia e resistência bacteriana em unidades de terapia intensiva através de culturas de vigilância.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Natal, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/23573/1/MayaraMariaBastosFranco_DISSERT.pdf> Acesso em: 04 jul. 2017.

GUIMARAES, D. O. et al. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quím. Nova,** São Paulo, Vol. 33, No. 3, 667-679, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n3/35.pdf>>. Acesso em: 05 jun 2017.

HASSAN, S. M. et al. Protective effects of apigenin and myricetin against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. **Journal Pharmaceutical Biology,** v. 55, 2017. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13880209.2016.1275704?scroll=top&needAccess=true>>. Acesso em 10 jul. 2017.

HO, G. T. T. et al. Effect of phenolic compounds from elderflowers on glucose-and fatty acid uptake in human myotubes and HepG2-cells. **Molecules,** v. 22, n. 1, p. 90, 2017.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal.** São Paulo: Editora Nacional, 11 ed., v. 4, 1993. 777 p.

KARLING, M. et al. Estudo do potencial antioxidante do bagaço de uva utilizando técnica de fracionamento líquido-líquido. **Syn. sey. UTFPR,** Pato Branco, v. 12, n. 1, p. 88-93, 2017.

LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE). São Carlos: RiMa, 2004. 93 p.

LEONARDI, G. R. Cosmetologia Aplicada. 1.ed. São Paulo: Editora MEDFARMA, 2005.

LIMA, C. M. (Org.). **Bacuri: Agrobiodiversidade**. 1. ed. São Luis, 2007. 200p. Disponível em: <http://www.iicabr.iica.org/wp-content/uploads/2014/03/Bacuri_Agrobiodiversidade.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2016.

LINS, A. C. S. et al. Constituintes Químicos e Atividade Antioxidante das Partes Aéreas de *Clusia paralicola* (Clusiaceae) e *Vismia guianensis* (Hypericaceae). **Rev. Virtual Quim.**, 2016, 8 (1), 157-168.

LOPES, D. C.D. X. P.; SANTOS, E. P.; TOMASSINI, T. C. B. Atividade antisséptica de formulações contendo extrato etanólico de frutos de *Physalis angulata* L. **Rev. Bras. Farm.**, 86(2): 75-77, 2005. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Elisabete_Santos/publication/235993155_Antiseptic_cosmetic_formulations_using_Physalis_angulata_L._fruit's_ethanolic_extract/links/0c9605154dc67f03800000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Elisabete_Santos/publication/235993155_Antiseptic_cosmetic_formulations_using_Physalis_angulata_L._fruit's_ethanolic_extract/links/0c9605154dc67f0380000000.pdf)>. Acesso em: 23 jun. 2017

MAK, J.K.; KIM, M.J.; PHAM, J. et al. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother.** 2009;63(1):47-54.

MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. *Acinetobacter* multirresistente—um desafio para a saúde pública. **Sci Med**, v. 23, n. 1, p. 56-62, 2013.

MATOS, F. J. de A. Introdução a fitoquímica experimental. 3. ed. Fortaleza: UFC, 2009. 150 p.

MCLAUGHLIN, J. L. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. **Meth Plant Biochem**, 1991; 6:1–32.

MELO, R. R. **Perfil fitoquímico, avaliação da atividade antimicrobiana e biocompatibilidade de *Syzygium malaccense* (L) Merr. & L. M. Perry (Myrtaceae)**. 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian Plant extracts for antioxidant Activity by the use of DPPH Free Radical method. **Phytotherapy Research**. v. 15, p. 127-130, 2001.

MEYER, B.N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, n.5, p.31-4, 1982.

MIGLIATO, K. F.; CARVALHO, E.S; SACRAMENTO, L. V. S.; MELLO, J. C. P.; BABY, A.R.; VELASCO, VELASCO, M. V. R.; SALGADO, H. R. N. Total polyphenols from *Syzygium cumini* (L.) Skeels fruit extract. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. Vol. 45, n. 1, jan./mar., 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjps/v45n1/15.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2017.

MORAIS, S. M. de; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A.; Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil; **Rev. Bras. Farmacogn.**; 9; 315-320; 2009.

NASCIMENTO, J. C. et al. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Rev. Bras. Farm.** 92(4): 327-332, 2011.

NASCIMENTO G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz J Microbiol** 2000; 31(4):247-56. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822000000400003>. Acesso em: 01 jul. 2017.

NAVES, V. M. L. **Brasiliensis e avaliação do seu perfil de permeação cutânea em formulações dermatológicas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

OLOYEDE, K. G.; OKE, M. J.; RAJI, Y.; OLUGBADE, T. **Antioxidant and anticonvulsant alkaloids in *Crinum ornatum* bulb extract**. *World J Chem.* 2010;5: 26–31. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/280650872_Antioxidant_and_Anticonvulsant_alkaloids_in_Crinum_ornatum_Bulb_Extract>. Acesso em: 08 jul. 2017.

O'NEILL, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: final report and recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance**. United Kingdom, 2016. Disponível em: <https://amrreview.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2017.

OZAN. F. et al. Effect of mouthrinse containing propolis on oral microorganisms and human gingival Fibroblasts. **Eur J Dent** 2007; 1(4):195-201. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2609911/>> Acesso em: 01 jul. 2017.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para Avaliação e Pesquisa da Atividade Antimicrobiana de Produtos de Origem Natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Curitiba, v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A., CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. **Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis***. *Antimicrob Agents Chemoter*, 46(8): 2720–2722; 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC127336/>> Acesso em: 23 jun. 2017.

PARAAKH, M. P.; RAVICHANDRA, V. D. Natural Compounds as Anti Microbial Agents with In Silico Technique: A Review. **International Journal of Pharma Research and Health Sciences.**; 4 (4): 1252-1260, 2016. Disponível em: <<http://www.pharmahealthsciences.net/pdfs/volume4-issue42016/1.vol4-issue4-2016-MS-15299-review1.pdf>>. Acesso em: 01 jul. 2017.

PAYNE, D. J. et al. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 6, n. 1, p. 29, 2007.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin Microbiol Rev.** 2008;21(3):538-82. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2493088/>> Acesso em: 05 jul. 2017.

RAMOS, D. D. et al. Atividade antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.41, n.8, p.1331-1336, 2011.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; **Farmacologia**, 4a ed., Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 2001.

RENWICK, M. J.; BROGAN, D. M.; MOSSIALOS, E. A systematic review and critical assessment of incentive strategies for Discovery and development of novel antibiotics. **The Journal of Antibiotics**, 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1038/ja.2015.98>>. Acesso em: 01 jul. 2017.

ROCHA, C. Q. et al. Dimeric flavonoids from Arrabidaea brachypoda and assessment of their anti-Trypanosoma cruzi activity. **Journal of natural products**, v. 77, n. 6, p. 1345-1350, 2014.

RODRIGUES T.S.; GUIMARÃES S.F.; RODRIGUES D. D. R.G.; GABRIEL, J.V. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Rev. bras. plantas med.** 2011. Disponível: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000500014>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

RUFINO, M. S. et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Fortaleza, CE. 2007. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426953/1/Cot127.pdf>>. Acesso em 23 Jul 2017.

RUIZ, A.L.T.G. et al. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n. 2, p.98-102, 2005.

SANTOS, P. R. P. dos. et al. Levantamento das propriedades físico-químicas e farmacológicas de extratos e compostos isolados de *Platonia insignis* Mart. uma perspectiva para o desenvolvimento de fitomedicamentos. **Rev. Bras. Farm.** 94 (2): 161-168, 2013. Disponível em: <<http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-94-2-12-2013.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2017.

SANTOS JÚNIOR R. Q. et al. Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platonia insignis* Mart.). **ConScientiae Saúde**. 9(4): 575-581, 2010. Disponível em: <<http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-94-2-12-2013.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2017.

SILVA, L. A. G. et al., Controle de qualidade microbiológico de formulação magistral contendo fitoterápico. **Revista Faculdade Montes Belos (FMB)**, v. 7, nº 2, 2014. Disponível em: <http://www.fmb.edu.br/revistaFmb/index.php/fmb/article/view/119/114> Acesso em: 20 jun. 2017.

SILVA, J. K. R. **Estudo químico e das propriedades biológica dos óleos essenciais e extratos de espécies de Piper da Amazônia Oriental**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Química, 2010.

BENTES, M. H. S. et al. Estudo químico das sementes de bacuri. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 16, p. 363-368, 1986. Acesso em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59671986000100363>. Acesso em: 11 jul. 2017.

SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 4, 844-855, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v29n4/30269.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2017.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 1102p.

SOMERA, B. F. et al. Avaliação da atividade antisséptica de sabonete líquido contendo extrato glicólico de flores de *Tagetes patula* L. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 3, p. 461-467, set/ dez. 2015. Disponível em: <<http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/3991/2694>>. Acesso em: 26/ jun./ 2017.

TAKEUCHI, F. et al. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 21, p. 7292-7308, 2005.

ONU, United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2015). World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables. **Working Paper** No. ESA/P/WP.241. Disponível em: <https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/key_findings_wpp_2015.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2017.

VIEIRA, L. M. et al. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 3, p. 888-897, Setembro 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v33n3/aop09711.pdf>> Acesso em: 10 jun. 2017.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**. v. 406, p. 775-781, 2000. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v406/n6797/pdf/406775a0.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2017.

WHO, World Health Organization. **Traditional Medicine Strategy: 2014-2023**. Geneva: World Health Organization; 2013. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090_eng.pdf?ua=1> Acesso em: 20 jun. 2017.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, C. The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Production - A Review. **J. Agric. Food Chem.**, Vol. 53, No. 21, 2005. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/7546783_The_Impact_of_Saponins_or_Saponin-Containing_Plant_Materials_on_Ruminant_ProductionA_Review>. Acesso em: 08 jul. 2017.

WOLFGANG, J. W. P.; PFANNENBECKER, U.; HOPPE, U. Validation of Red Blood Cell Test System as in Vitro Assay for the Rapid Screening of Irritation Potencial of Surfactants. **Molecular Toxicology**, v. 1, p. 525-536, 1987.

YAACOB, O.; TINDALL, H. D. Mangoste encultivation. Rome: FAO, 1995. 100 p. **Plant Production and Protection Paper**, 129.

YAMAGUCHI, K. K. L. et al. Química e Farmacologia do Bacuri (*Platonia insignis*).

Scientia Amazonia, v. 3, n.2, 39-46, 2014. Disponível em:

<<http://www.scientia.ufam.edu.br/attachments/article/30/v3%20n2%2039-46%202014.pdf>>.

Acesso em: 30 jan. 2016

ANEXOS

ANEXO A - Requerimento de patente concedida pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 001529 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Universidade Federal do Maranhão

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CNPJ/CPF: 06279103000119

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. dos Portugueses, 1966 - Cidade Universitária Dom Delgado, Vila Bacanga.

Cidade: São Luís

Estado: MA

CEP: 65080-805

País: Brasil

Telefone: (98) 32728710

Fax:

Email: nit-dapi@ufma.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 25/01/2017 às 09:51, Petição 870170005087

ANEXO A - Requerimento de patente concedida pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI.

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FITOTERÁPICO ANTIMICROBIANO OBTIDO A PARTIR DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Platonia Insignis* (Bacurí)
Resumo: A referida invenção compreende a obtenção de um fitoterápico antimicrobiano a partir do extrato das folhas de *Platonia Insignis* em diferentes apresentações, tais como cápsula, solução, xarope, comprimidos, gel, aerossóis, colutório, creme, pó, pasta, pomada e pellet com ação microbicida contra diversas bactérias e fungos de interesse clínico para tratamento isolado ou associado de infecções fúngicas e bacterianas para uso humano.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 25/01/2017 às 09:51, Petição 870170005087