



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Talisia esculenta*
Radlk**

José Helvecio Sales Junior

São Luís

2019

JOSÉ HELVECIO SALES JUNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Talisia esculenta*
Radlk**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Linha de Pesquisa: Doenças crônicas e doenças infecciosas e parasitárias/Infectologia no adulto

Orientador: Prof^a Dr^a Patrícia de Maria da Silva Figueiredo

Coordenador: Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

São Luís

2019

Sales Junior, José Helvecio.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DE *Talisia esculenta* Radlk. / José
Helvecio Sales Junior. - 2019.

63 p.

Orientador(a): Patrícia de Maria Silva Figueiredo.
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação
em Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do
Maranhão, São Luís, 2019.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Bioprodutos.
3. Flavonóides. 4. ; Pitomba. 5.
Talisia esculenta Radlk.
- I. Silva Figueiredo, Patrícia de Maria. II. Título.

JOSÉ HELVECIO SALES JUNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Talisia esculenta*
Radlk**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde do Adulto da Universidade
Federal do Maranhão para obtenção de aprovação
no Exame de Qualificação

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública,
considerou o candidato aprovado em: ____/____/____.

Prof^a. Dr^a Patrícia de Maria Silva Figueiredo (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. ... (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. ... (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. ... (Examinador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, pelas bênçãos e por me iluminar todos os dias.

Aos meus pais por todo amor, apoio incondicional e incentivo durante todos os dias desses 2 anos.

Ao LABMIC pelo apoio estrutural e científico, em especial Larissa, Thiago e Andressa pelo grande apoio e ajuda.

À professora Dr^a Patricia de Maria Silva Figueiredo pela oportunidade de realizar este trabalho e pela orientação impar.

À UFMA e aos mestres do PPGSAD que tanto contribuíram para a minha formação.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

RESUMO

A espécie *Talisia esculenta* Radlk é popularmente conhecida como pitomba. A planta é comum em áreas de matas úmidas e secas do Norte ao Nordeste do Brasil e pode ser encontrada facilmente em feiras livres ou supermercados e as árvores que existem são de ocorrência natural. A pitomba tem sido estudada devido a presença de compostos fitoquímicos que exercem uma série de atividades biológicas, tais como a atividade antioxidante. Entretanto estudos com atividade antimicrobiana são escassos. Dessa forma, investigou-se a ação do extrato hidroetanólico da folha dessa espécie frente a cepas de fungos e bactérias e também uma micobactéria com o objetivo de desenvolver uma nova alternativa terapêutica (antimicrobiano). O extrato foi preparado por maceração do material vegetal. A atividade antioxidante foi realizada pela metodologia de sequestro do radical DPPH. Utilizou-se a técnica de microdiluição para determinação da CIM e CBM. A atividade citotóxica foi avaliada para redução do sal de tetrazólio. Os bioprodutos desenvolvidos foram creme aniônico 5% e creme vaginal 5% do extrato da folha que também foi avaliado sua atividade antimicrobiana. Na análise cromatográfica foram identificados ácidos fenólicos e flavonoides como a quercitina e acacetina. O extrato apresentou atividade antioxidante dose-dependente, cujo percentual máximo de atividade para o extrato da folha foi de 18.41 ± 0.18 . O extrato da folha testado na concentração de 100mg/mL inibiu o crescimento de bactérias como *E. coli* ATCC 25922, cuja CIM foi 25mg/mL. O extrato também inibiu o crescimento de fungos, como *C. albicans* ATCC 90028, cuja CIM foi 3,125mg/mL. O Creme aniônico 5% da folha também inibiu o crescimento de *E. coli* ATCC 25922, cujas CIM foi idêntica ao do extrato bruto. O creme vaginal 5% do extrato da folha também inibiu o crescimento de *C. parapsilosis* ATCC 22019. O extrato e bioprodutos se apresentaram não irritativos frente à hemácias bem como às culturas de células testadas (Macrófagos RAW 264.7). Os bioprodutos não apresentaram alterações físicas de estabilidade significantes durante os períodos de tempo analisados (30 e 60 dias). O pH apresentou variação de valor nos ambientes testados (geladeira, estufa e ambiente), onde os maiores valores foram para o ambiente da geladeira. Dessa forma, o extrato e bioprodutos apresentam atividade antimicrobiana notável, bem como ação antioxidante, não apresentam ação irritativa para hemácias, bem como não são tóxicos às células testadas, comprovando a segurança toxicológica. Os bioprodutos mostraram-se potencialmente viáveis no desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de doenças infecciosas e apresentaram boa estabilidade físico-química e microbiológica.

Palavras-chave: *Talisia esculenta* Radlk; Pitomba; Flavonóides; Atividade antimicrobiana; Bioprodutos

ABSTRACT

The *Talisia esculenta* Radlk species is popularly known as pitomba. The plant is common in wet and dry forest areas from North to Northeast of Brazil and can be found easily in open markets or supermarkets and the trees that exist are naturally occurring. Pitomba has been studied due to the presence of phytochemical compounds that exert a series of biological activities, such as antioxidant activity. However studies with antimicrobial activity are scarce. Thus, it was investigated the action of the hydroalcoholic extract of the leaf of this species against strains of fungi and bacteria and also a mycobacterium aiming to develop a new therapeutic alternative (antimicrobial). The extract was prepared by macerating the plant material. The antioxidant activity was performed by the DPPH radical sequestration methodology. The microdilution technique was used to determine MIC and MBC. Cytotoxic activity was evaluated to reduce tetrazolium salt. The bioproducts developed were 5% anionic cream and 5% vaginal cream of the leaf extract, which was also evaluated for its antimicrobial activity. The chromatographic analysis identified phenolic acids and flavonoids such as quercetin and acacetin. The extract showed dose-dependent antioxidant activity, whose maximum percentage of activity for leaf extract was 18.41 ± 0.18 . The leaf extract tested at a concentration of 100mg/mL inhibited the growth of bacteria such as *E. coli* ATCC 25922, whose MIC was 25mg/mL. The extract also inhibited the growth of fungi, such as *C. albicans* ATCC 90028, whose MIC was 3.125mg/mL. Anionic 5% leaf cream also inhibited the growth of *E. coli* ATCC 25922, whose MIC was identical to that of the crude extract. Vaginal cream 5% of leaf extract also inhibited the growth of *C. parapsilosis* ATCC 22019. The extract and bioproducts were non-irritating to red blood cells as well as cell cultures tested (Macrophages RAW 264.7). The bioproducts showed no significant physical stability changes during the analyzed time periods (30 and 60 days). The pH presented value variation in the tested environments (refrigerator, greenhouse and environment), where the highest values were for the refrigerator environment. Thus, the extract and bioproducts have remarkable antimicrobial activity, as well as antioxidant action, do not have red blood cell irritant action, and are not toxic to the cells tested, proving the toxicological safety. Bioproducts were potentially viable in the development of new products for the treatment of infectious diseases and showed good physicochemical and microbiological stability.

Keywords: *Talisia esculenta* Radlk; Pitomba; Flavonoids; Antimicrobial activity; Bioproducts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rota biossintética do metabolismo secundário dos vegetais.....14

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Componentes das formulações desenvolvidas a partir do extrato bruto de Pitomba: Creme aniônico 5% e Creme Vaginal 5%.....	29
Tabela 02 - Compostos identificados por LC-MS e FIA-ESI-IT-MS do extrato da folha de <i>Talisia esculenta</i> Radlk.....	32
Tabela 03 - Percentual de Atividade Antioxidante do extrato bruto das folhas de <i>Talisia esculenta</i> Radlk.....	35
Tabela 04 – Controle de qualidade microbiológico do extrato bruto e das formulações de <i>Talisia esculenta</i> Radlk. (após elaboração/T=0).....	37
Tabela 05 – Atividade antibacteriana do extrato bruto das folhas de <i>Talisia esculenta</i> Radlk. na concentração de 100mg/mL.....	37
Tabela 06 – Atividade antifúngica do extrato bruto da folha de <i>Talisia esculenta</i> Radlk. na concentração de 100mg/mL.....	39
Tabela 07 – Atividade antimicrobiana dos cremes aniônicos 5% formulados com o extrato da folha de <i>Talisia esculenta</i> Radlk.....	41
Tabela 08 – Atividade antifúngica dos cremes vaginais formulados com o extrato da folha frente a fungos padrão.....	43
Tabela 09 – Atividade antifúngica dos cremes vaginais formulados com o extrato da folha frente a fungos de isolados clínicos.....	44
Tabela 10 – Valores padrão de classificação do potencial irritativo.....	44
Tabela 11 – Valores de H ₅₀ , ID e razão H ₅₀ /ID do extrato das folhas de <i>Talisia esculenta</i> Radlk. e das bases utilizadas para manipulação dos bioprodutos.....	45
Tabela 12 – Testes de controle de qualidade dos bioprodutos logo após a formulação em temperatura ambiente.....	46

Tabela 13 – Avaliação da estabilidade após 30 e 60 dias do creme aniônico 5% à base do extrato bruto da Folha de *Talisia esculenta* Radlk.....47

Tabela 14 – Avaliação da estabilidade após 30 e 60 dias do creme vaginal 5% à base do extrato bruto da Folha de *Talisia esculenta* Radlk.....48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

MeOH – Metanol

ATCC - American Type Culture Collection

BHI - Brain Heart Infusion

UFC – Unidade formadoras de colônia

PCA - Plate Count Agar

RPM – Rotação por minuto

Nm - Nanômetro

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

[M-H]⁻ - Massa por carga de íons

MSⁿ - Espectrometria de Massas

CE₅₀ - Concentração Efetiva p

CIM – Concentração inibitória mínima

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CN – Controle Negativo

ND – Não definido

NI – Não Irritante

EHTe – Extrato Hidroetanólico de *Talisia esculenta*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1. Princípios Ativos Naturais.....	13
2.2. Atividade Antimicrobiana de produtos naturais.....	14
2.3. Resistência microbiana e Saúde Pública.....	16
2.4. <i>Mycobacterium Abcessus</i>.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo Geral.....	19
3.2. Objetivo Específicos.....	19
4. RESULTADOS: ARTIGO.....	20
5. CONCLUSÃO.....	59
ANEXOS – GUIA DE NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS DA REVISTA FITOTERAPIA (QUALIS A3).....	62

1. INTRODUÇÃO

O Brasil contempla uma das maiores biodiversidades do mundo, com aproximadamente 43.020 espécies vegetais identificadas. A ampla extensão territorial e variação climática do país favorece o surgimento de biomas únicos e ricos em espécies vegetais nativas, que são utilizadas pelas comunidades - seja para consumo e/ou como fonte de renda (BRASIL, 2018).

Nos últimos anos o interesse nas espécies vegetais nativas aumentou consideravelmente, tanto por parte dos pesquisadores como dos consumidores que estão cada vez mais preocupados com estilo de vida e hábitos alimentares saudáveis. Vários estudos reportam que diversas espécies vegetais contêm substâncias que podem propiciar benefícios à saúde que são atribuídos à presença de compostos bioativos, dos quais muitos com ação antioxidante, eficazes na proteção contra doenças crônicas não transmissíveis, tais como doenças cardiovasculares e câncer (ALU'DATT et al. 2017; GHANI et al 2017; VIRGOLIN, et al 2017).

A espécie *Talisia esculenta* Radlk. conhecida como pitombeira, pitomba, olho-de-boi, pitombarana ou feijão-cru é nativa da Amazônia, ocorrendo também na região fronteira ao Norte do Brasil e região Nordeste (ACEVEDO-RODRÍGUEZ, 2015).

Botanicamente é classificada em perenifolia ou semidecídua e heliófita, característica da floresta pluvial, a qual é encontrada tanto no interior de matas densas primárias, como em formações secundárias, mas sempre em várzeas aluviais e fundos de vales por quase todo o Brasil, (LORENZI, 2016). Na região Nordeste, *T. esculenta* é encontrada nas capoeiras ralas de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (ACEVEDO-RODRÍGUEZ, 2017).

Os indivíduos de *T. esculenta* são de porte arbóreo, com altura variando de 4-8 m. As flores são pequenas, brancas e de aroma agradável, distribuídas em panículas terminais, com florescimento de agosto a outubro, podendo estender-se até o início do ano seguinte, dependendo da região de ocorrência (LORENZI, 2016).

A comercialização dos frutos (pitombas) de *T. esculenta* nas feiras-livres, supermercados e ruas do Nordeste começa no mês de janeiro e se estende até agosto, onde mais de 90% de toda a oferta está concentrada nos meses de abril e julho, com picos de produção em abril (23,4%) e maio (31,4%) (SENA, 2014)

A pitomba e seus derivados são utilizados na culinária das regiões Norte e Nordeste, cuja polpa é consumida *in natura* e utilizada na fabricação de alimentos, cujo sabor lembra o damasco (*Prunus armeniaca* L.) (QUEIROGA, 2015). A polpa da pitomba, além de atividade antioxidante (SOUZA et al., 2016; FRAGA, 2018), possui características físicas, químicas e funcionais de excelente qualidade, com alto teor de proteína, flavonoides e carotenoides, de sólidos solúveis e vitamina C.

Entre as atividades biológicas, estudos recentes indicam atividades antiproliferativa, antimutagênica e antioxidante do extrato bruto de pitomba, além da identificação de miricetina e quercetina no extrato hidrolisado da polpa (NERI-NUMA et al, 2014). Alguns estudos sobre a semente, relatam a extração de uma proteína chamada lectina, usada no combate a fungos causadores de doenças de plantas cultivadas e de pragas como besouros que atacam as plantas (MACEDO, et al., 2011; FREIRE, et al., 2012).

As sementes de pitomba e óleo essencial têm sido estudadas como fonte de compostos que exercem uma série de atividades biológicas, como a atividade inseticida, (FREIRE et al, 2012). Entretanto os estudos com atividade antimicrobiana nessa espécie são escassos ou inexistentes com bactérias e/ou fungos de interesse clínico ao homem. O que reforça a necessidade de investigação dessa espécie que se apresenta bastante promissora na elucidação de novos compostos com essa atividade.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Princípios Ativos Naturais

As plantas têm uma capacidade quase ilimitada para sintetizar várias substâncias provenientes do seu metabolismo primário (carboidratos, proteínas, ácidos graxos e ácidos nucléicos e secundário), são substâncias essenciais à sobrevivência e desenvolvimento do vegetal. (GORNI, 2018). Em muitos casos, estas substâncias servem como mecanismos de defesa da planta contra a predação por micro-organismos, insetos e herbívoros, exercendo um papel importante na sobrevivência da planta em seu ecossistema. Ainda, algumas substâncias, como os terpenóides, conferem odores aos vegetais; outras, como as quinonas e taninos, são responsáveis pela pigmentação (GALLEGOS et al, 2019).

Assim como os metabólitos primários, praticamente todos os metabólitos secundários são formados do metabolismo da glicose (figura 1). Esta é convertida em moléculas de ácido pirúvico que podem seguir duas vias metabólicas distintas. Na primeira, moléculas de piruvato entram na via do ácido chiquímico para formar todos os metabólitos secundários aromáticos (alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis (SIMÕES et al., 2007).

Na segunda, o piruvato é oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-coA) que podem seguir por três vias diferentes: via do ciclo do ácido cítrico, via do mevalonato e via da condensação do acetato. Os produtos destas três vias são os alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos, os terpenóides, os esteróis e as acetogeninas. A ligação entre ácido chiquímico e acetato ou derivados destes resultam na produção de antraquinonas, flavonóides e dos taninos condensados (SIMÕES et al., 2007) (Figura 1).

Estes compostos bioativos são os responsáveis pelas propriedades terapêuticas encontrada nas plantas medicinais. O efeito farmacológico pode

também ser resultante da ação de uma ou mais substâncias presentes na composição química da planta, denominada de princípio ativo.

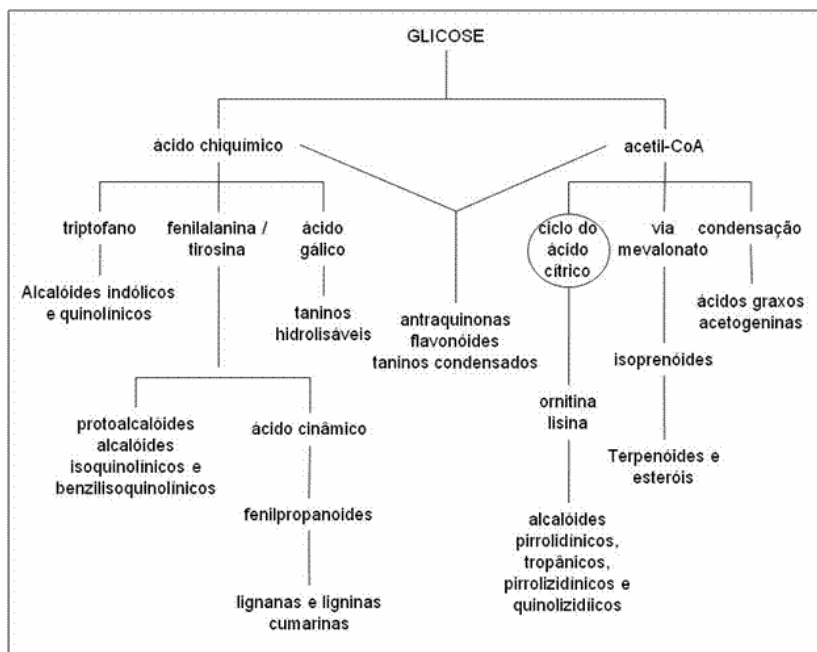


Figura 1. Rota biossintética do metabolismo secundário dos vegetais (SIMÕES et al., 2007)

2.2. Atividade Antimicrobiana de produtos naturais

Os antimicrobianos ou antibióticos são fármacos utilizados com o intuito de provocar a morte ou inibir o crescimento de determinado agente microbiano. São originados de substâncias produzidas pelos próprios micro-organismos, oriundas de vegetais ou mesmo sintéticas (ALTERTHUM; TRABULSI, 2003).

O aumento da resistência microbiana aos antibióticos é um problema de grande relevância enfrentado nas últimas três décadas (MUNIZ et al., 2019). Uma bactéria é resistente a um determinado antibiótico quando esta é capaz de crescer *in vitro* em presença da concentração inibitória mínima deste fármaco. A resistência pode ser natural, onde os genes da bactéria codificam enzimas que inativam o mecanismo de ação do fármaco; ou adquirida, quando a bactéria torna-se resistente a um fármaco sensível, por meio da aquisição de fatores genéticos ou mutação em seus genes de defesa (TAVARES, 2006).

Devido ao aumento de micro-organismos patogênicos resistentes a

múltiplas drogas associado com o concomitante crescimento do número de pacientes imunocomprometidos surge à preocupação para a procura de novas alternativas terapêuticas (ANTUNES et al., 2006). Várias medidas tecnológicas são sugeridas para resolver o problema da resistência das bactérias, sendo uma delas a procura de novos antimicrobianos a partir de espécies vegetais (ALMEIDA et al, 2019).

Devido à rica diversidade, fácil acessibilidade e baixo custo de produtos naturais de origem vegetal, muitos países têm investido fortemente em pesquisas para obtenção de substâncias com atividade antimicrobiana advindas de plantas já conhecidas popularmente como medicinais. No sul do Texas, foi verificada a atividade antibiótica de 23 extratos de ervas comumente usadas para o tratamento de infecções. Destas 23 ervas 10 inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* e 9 ervas o crescimento de duas espécies gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (ROMERO et al., 2005).

O Brasil é conhecido mundialmente pela sua grande e destacada biodiversidade. Toda esta riqueza estimula o estudo das possíveis ações terapêuticas de plantas usadas pela medicina popular de diversas regiões do país. Neste contexto, estão inseridas pesquisas que visam determinar a atividade antimicrobiana, como por exemplo, a realizada por esse estudo. A Amazônia, região que ultrapassa as fronteiras brasileiras, destaca-se por apresentar uma variedade significativa de espécies vegetais. Virtuoso et al. 2005, observaram atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da *Erythrina velutina*, planta utilizada na medicina popular do nordeste brasileiro, contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*.

Os compostos isolados de plantas são substâncias cuja estrutura química, com raras exceções, apresenta grandes diferenças estruturais em relação aos antibióticos derivados de micro-organismos (GONÇALVES et al., 2005). Alguns mecanismos responsáveis pela ação antimicrobiana dos princípios ativos extraídos de plantas já foram estudados e estão relacionados com a regulação do metabolismo intermediário da bactéria através do bloqueio

de reações químicas, da ação direta sobre a síntese enzimática, ou mesmo de alterações nas estruturas de membrana (COWAN, 1999).

2.3. Resistência microbiana e Saúde Pública

Com a introdução de fármacos eficientes no combate às infecções, melhoras significantes no tratamento médico das doenças infecciosas foram obtidas, ocasionando em uma considerável redução das taxas de morbidade e mortalidade, permitindo grandes progressos na medicina (COSTA, et al., 2012)

Porém o uso desordenado e sem orientação desses fármacos leva ao aparecimento de micro-organismos resistentes aos tratamentos com esses medicamentos. Esses micro-organismos se acumulam e se disseminam, representando um sério risco para a população, por diminuírem as opções de fármacos efetivos para o tratamento de infecções, podendo assim aumentar as complicações clínicas de pacientes hospitalizados e prolongar o tempo de estadia hospitalar, elevando os custos direcionados à recuperação dos pacientes doentes e com saúde pública (SIQUEIRA, 2004)

A resistência aos antimicrobianos pode ser adquirida como resultado de mutações que podem ocorrer durante os processos de divisão celular ou serem induzidas por intermédio de agentes mutagênicos como radiações ionizantes, por exemplo (BAPTISTA, 2013). Uma característica intrínseca de certas espécies de bactérias que podem resistir à ação de um dado antibiótico como resultado de uma característica estrutural ou funcional inerente de dada espécie (BLAIR et al., 2015); 3). E adquirida pela aquisição de material genético exógeno anteriormente presente em outros micro-organismo que contenham genes de resistência (TAVARES, 2000; COSTA, 2016)

Neste contexto, algumas medidas podem ser feitas para dificultar a disseminação desses micro-organismos como por exemplo o planejamento, organização e execução de ações educativas de saúde, contenção e preventivas da disseminação de patógenos resistentes ou não em ambientes hospitalares, laboratoriais, ambulatoriais e domésticos. Essas medidas englobam: as fontes de infecção, ou seja, todos os hospedeiros e meios que podem manter um agente infeccioso viável e apto para infectar novos

hospedeiros; 2) as vias de eliminação, ou seja, as formas pelas quais pode ocorrer a saída de um agente infeccioso a partir de uma fonte de infecção, como por exemplo, as secreções naso-buco-faríngeas, as fezes, urina, sangue, escarro, exudatos, descargas purulentas, descamações epiteliais, o suor, o leite materno e outras vias como a placentária e a via sexual; e 3) as vias de transmissão que são os meios pelos quais o hospedeiro interage com o agente causador de doença, (LESSER et al., 1985; SAKER et al., 2004).

Em relação aos fatores epidemiológicos para o controle das doenças infecciosas, o Brasil ainda não possui manuais destinados ao combate de patógenos resistentes que englobem a nossa realidade regional e sócio-econômica. Neste âmbito, pode-se afirmar que trabalhos baseados na realidade nacional, regional e de cada estado do país, em relação à incidência e prevalência de casos de infecções causadas por patógenos resistentes nos estabelecimentos de saúde podem nortear o planejamento e a logística das ações e serviços de saúde como vigilância ambiental e vigilância sanitária, favorecendo a execução de estratégias institucionais, administrativas, programáticas e sociais fundamentadas em políticas públicas especificamente desenvolvidas para reduzir e prevenir os riscos à saúde mais comuns, em cada localidade (OLIVEIRA; CRUZ, 2015)

2.4. *Mycobacterium abscessus*

O gênero *Mycobacterium* inclui espécies do complexo *M. tuberculosis* e as denominadas Micobactérias Não Tuberculosas (MNT). Este último grupo é constituído por micro-organismos saprófitos presentes no solo, água e poeira e são capazes de sobreviver a condições extremas de nutrientes, pH e temperatura pela formação de biofilmes (MEDJAHED et al, 2010)

As MNTs podem ser classificadas de acordo com o tempo de crescimento em Micobactérias de Crescimento Lento (MCL), que formam colônias visíveis em meio sólido após sete dias e em Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR), que apresentam colônias visíveis em meio sólido de três a sete dias. (MEDJAHED et al, 2010)

M. abscessus é uma MCR acromógena e apresenta colônias com morfologia rugosa a lisa. Historicamente, era considerada como subespécie de

M. chelonae ou ainda considerada parte do complexo *Mycobacterium fortuitum*. Desde 1993, é possível distinguir essa espécie por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de restrição enzimática do gene *hsp65*, com sequências conservadas entre as espécies. (CATHERINOT et al, 2007)

M. abscessus é dividida em três subespécies: *M. abscessus sensu stricto*, *M. massiliense* e *M. bolletii* (ADÉKAMBI, 2004). Entretanto, verificou-se pela técnica de homologia DNA-DNA que *M. massiliense* e *M. bolletii* são geneticamente idênticas, sugerindo a junção das espécies em uma subespécie, *M. abscessus* subespécie *bolletii*.

Atualmente, esta espécie é dividida em duas subespécies: *M. abscessus* subespécie *abscessus* e *M. abscessus* subespécie *bolletii* (LEÃO, 2009). Este grupo causa diversos tipos de infecções teciduais, sendo as infecções cutâneas e infecções pulmonares as mais comuns, principalmente em crianças, pacientes imunocomprometidos e pacientes com doenças pulmonares crônicas (LEÃO, 2010).

M. abscessus é muito resistente, tanto *in vivo* como *in vitro*, à maioria dos agentes quimioterápicos. No tratamento das infecções causadas por este patógeno, é necessária a remoção do tecido lesionado, necrosado e também a remoção de corpos estranhos como próteses de silicone e outros materiais. Em pacientes com infecções pulmonares, as cirurgias podem ter papel importante na cura, se for possível realizá-las (WONGKITISOPHON et al, 2011).

Esta espécie é naturalmente sensível à claritromicina, azitromicina e amicacina, sendo esta última a mais importante no tratamento, devendo ser combinada com a administração de outros fármacos. Entretanto, pode ocorrer, resistência à claritromicina, especialmente em casos de monoterapia, o que pode se tornar um verdadeiro problema no prognóstico dos pacientes (GAYATHRI, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- ✓ Desenvolver bioprodutos derivados do extrato bruto das folhas de *Talisia esculenta* Radlk. com potencial antimicrobiano.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Verificar o perfil fitoquímico do extrato bruto hidroetanólico a partir das folhas de *Talisia esculenta* Radlk;
- ✓ Obter informações estruturais do extrato bruto através de LC-MS e FIA-ESI-IT/MSⁿ;
- ✓ Avaliar o potencial antioxidante do extrato de *Talisia esculenta* Radlk em diferentes concentrações;
- ✓ Avaliar a Estabilidade físico-química das formulações e Controle de Qualidade das formulações e extratos brutos
- ✓ Verificar atividade biológica pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extratos brutos e dos bioprodutos.
- ✓ Verificar o potencial irritativo do extrato de *Talisia esculenta* Radlk. frente a hemácias;
- ✓ Avaliação da citotoxicidade celular do extratos bruto da folha de *Talisia esculenta* Radlk

4.0. ARTIGO

- ✓ Artigo submetido à revista Fitoterapia (Qualis: A3; Fator de impacto: 2.431; ISSN: 0367-326X)

Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico de *Talisia esculenta* Radlk

José Helvecio Sales Junior^{1*}; Patrícia de Maria da Silva Figueiredo¹

¹: Laboratório de Microbiologia Clínica, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Maranhão, 65085-580. São Luís, Maranhão, Brasil

*: e-mail para correspondência para o autor: jh.junior@hotmail.com.br

A espécie *Talisia esculenta* Radlk é popularmente conhecida como pitomba. A planta é comum em áreas de matas úmidas e secas do Norte ao Nordeste do Brasil. A pitomba tem sido estudada devido a presença de compostos fitoquímicos que exercem uma série de atividades biológicas como a atividade antioxidante. Entretanto estudos com atividade antimicrobiana são escassos. Dessa forma, investigou-se a ação do extrato da folha dessa espécie frente a cepas de fungos e bactérias e também uma micobactéria com o objetivo de desenvolver uma nova alternativa terapêutica (antimicrobiano). O extrato foi preparado por maceração do material vegetal. A atividade antioxidante foi realizada pela metodologia de sequestro do radical DPPH. Utilizou-se a técnica de microdiluição para determinação da CIM e CBM. A atividade citotóxica foi avaliada para redução do sal de tetrazólio. Os bioprodutos desenvolvidos foram creme aniônico 5% e creme vaginal 5%. Na análise cromatográfica foram identificados compostos como quercitina e acetina. O extrato apresentou atividade antioxidante dose-dependente, cujo percentual máximo foi de 18.41±0.18. O extrato da folha testado na concentração de 100mg/mL inibiu o crescimento de bactérias como *E. coli* ATCC 25922, cujas CIM foi 25mg/mL, e fungos, como *C. albicans* ATCC 90028, cujas CIM foi 3,125mg/mL. O Creme aniônico 5% da folha também inibiu o crescimento de *E. coli* ATCC 25922, cuja CIM foi idêntica ao do extrato bruto. O creme vaginal 5% do extrato da folha também inibiu o crescimento de *C. parapsilosis* ATCC 22019. O extrato e bioprodutos se apresentaram não irritativos frente à hemácias bem como às culturas de células testadas (Macrófagos RAW 264.7). Os bioprodutos não apresentaram alterações físicas de estabilidade significantes durante os períodos de tempo analisados (30 e 60 dias). Dessa forma, o extrato e bioprodutos apresentam atividade antimicrobiana notável, bem como ação antioxidante, não apresentam ação irritativa para hemácias, bem como não são tóxicos às células testadas, comprovando a segurança toxicológica. Os bioprodutos mostraram-se potencialmente viáveis no desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de doenças infecciosas.

Palavras-chave: *Talisia esculenta* Radlk; Pitomba; Flavonóides; Atividade antimicrobiana; Bioprodutos

1. INTRODUÇÃO

A família Sapindaceae apresenta cerca de 141 gêneros e 1.900 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (ACEVEDO-RODRÍGUEZ et al., 2017). No Brasil esta família está representada por aproximadamente 418 espécies, distribuídas em 28 gêneros, com 126 espécies de ocorrência na Mata Atlântica nordestina (BFG, 2015).

A espécie *Talisia esculenta* Radlk botanicamente é classificada em perenifolia ou semidecídua e heliófita, característica da floresta pluvial, a qual é encontrada tanto no interior de matas densas primárias, como em formações secundárias, mas sempre em várzeas aluviais e fundos de vales por quase todo o Brasil, (LORENZI, 2016). Na região Nordeste, *T. esculenta* é encontrada nas capoeiras ralas de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (ACEVEDORODRÍGUEZ, 2017).

A pitomba tem grande aceitação pela população nordestina e pode ser encontrada facilmente em feiras livres ou supermercados. Atualmente não se tem plantio organizado para fins comerciais, e as árvores que existem são de ocorrência natural. Pode ser consumida in natura, no qual se nota a polpa de sabor doce e ácido (SANTOS, T. C.; JÚNIOR, J. E. N.; PRATA, A. P. N, 2012) .

As sementes de pitomba e óleo essencial têm sido estudadas como fonte de compostos que exercem uma série de atividades biológicas, como a atividade inseticida, (FREIRE et al, 2012). A polpa do fruto apresenta atividade antiproliferativa e antimutagenica (NERI-NUMA, 2014). Souza et al (2016) verificou a atividade antioxidante e compostos bioativos no extrato metanólico da polpa de pitomba.

Entretanto os estudos com atividade antimicrobiana nessa espécie são escassos ou inexistente com bactérias e/ou fungos de interesse clínico ao homem. O que reforça a necessidade de investigação e estudo dessa espécie que se apresenta bastante promissora na elucidação de novos compostos com essa atividade.

2. METODOLOGIA

2.1. Coleta e identificação do material botânico

As folhas de *Talísia esculenta* Radlk. selecionadas foram coletadas manualmente na área urbana do município de São Luís, Maranhão – Brasil, no bairro João Paulo. A coleta foi realizada no mês de Dezembro de 2018 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 01266

2.2. Obtenção do extrato hidroetanólico

As folhas foram coletadas e limpas manualmente, em seguida secas em temperatura ambiente. Posteriormente foram trituradas e pesadas. Após a trituração esses materiais foram adicionados a uma 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). As soluções extrativas foram filtradas a vácuo usando funil de Buchner, os filtrados foram evaporados em um evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura controlada a 40°C. Os materiais concentrados foram levados ao freezer, adequadamente vedado e mantido até ser liofilizado para posterior utilização nos testes. Nos testes onde se aplicou o extrato, o mesmo foi ressuspendido em água estéril na concentração de 100mg/mL.

2.3. Determinação do teor de polifenóis totais

O teor de fenóis do extrato foi obtido utilizando 100 µL da solução do extrato seco (2mg/mL) etanol, 100µL do reagente Folin-Ciocalteu (Merck®) e 1,0 mL da solução de carbonato de sódio a 20% por duas horas em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Concentrações de ácido gálico (Merck®) foram utilizadas como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS (Lambda 35, Perkin Elmer®) $\lambda=760$ nm. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por grama do EH. (Silva, 2010)

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

2.4.1. Análises de LC-MS

Para o HPLC-ESI-IT-MS / MS, foi realizada uma etapa de limpeza para remover quaisquer contaminantes; a solução foi purificada por 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 dos cartuchos utilizando 1 mL de MeOH: H₂O (1: 1, v / v) com um volume final de 5 mL. As amostras foram então filtradas através de um filtro PTFE de 0,22 µm e secas. O extrato foi diluído para 10 µg / mL em solvente HPLC. Alíquotas de 20 µL foram injetadas diretamente no LC-ESI-IT-MS (ROCHA et al 2014).

A análise foi realizada em um LC-ESI-MS-MS on-line e em um espectrômetro de massa LCQ Fleet, Thermo Scientific®. A coluna analítica utilizada para a separação por LC foi um Kinetex® C18 (2,1 x 100 mm, 100 Å e 5 µm). A análise foi realizada com água contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico (B) acrescidos de 0,1% de ácido fórmico em gradiente exploratório, iniciando com 10% a 100% em 6 minutos a vazão de 0,4. mL / min. A amostra foi infundida no espectrômetro de massa do sistema de HPLC, onde a amostra foi analisada on-line pelo ESI-MS em modo negativo e o detector UV associado. Os dados do espectro de massa foram obtidos no mesmo espectrômetro de massa Fleet LCQ da Thermo Scientific ® (ROCHA et al 2014).

2.4.2 Análises FIA-ESI-IT-MSn

Para o ensaio de FIA-ESI-IT-MSn a infusão de fluxo direto das amostras foi realizada em um analisador de armadilha iônica linear Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI), em modo negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Utilizou-se tubo capilar de aço inoxidável a 280°C, voltagem de 5,00 kV, voltagem capilar de -90 V, lente tubular de -100 V e fluxo de 5 µL min⁻¹. Análise de varredura completa foi registrada na faixa m / z de 100-1000. Fragmentações de múltiplos estágios

(ESI-MSn) foram realizadas usando 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 naquele intervalo de m/z . O segundo evento de varredura foi uma experiência de MS / MS realizada usando uma varredura dependente de dados nas moléculas [M-H] - dos compostos de interesse em uma energia de colisão de 30% e um tempo de ativação de 30 ms. Os íons do produto foram então submetidos à fragmentação adicional nas mesmas condições, até que não mais fragmentos foram observados. A identificação dos diferentes compostos no perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico foi realizada pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV com os dados da literatura. (ROCHA et al, 2014)

2.5. 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 absorvância inicial de aproximadamente $0,62 \pm 0,02$ ($\lambda = 517 \text{ nm}$), a temperatura ambiente. O extrato foi solubilizados em MeOH na concentração inicial de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a partir dessa concentração foram feitas sucessivas diluições de acordo com a reatividade da amostra. As concentrações variaram de 5 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. 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 (SILVA, 2010). No teste com o branco as amostras foram substituídas por metanol. A absorvância foi medida no primeiro minuto da reação ($t = 1$), e monitorada nos primeiros 5, 10 e 20 min. A atividade de sequestro do DPPH também foi expressa por meio da concentração mínima efetiva para reduzir a 50% da concentração inicial. A porcentagem de inibição dos radicais DPPH[•] (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.

2.6. Atividade antimicrobiana

2.6.1. Seleção das cepas bacterianas e fúngicas

As amostras bacterianas e fúngicas são oriundas do Laboratório de Microbiologia Clínica – Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão. Para realização dos testes foram utilizados micro-organismos padrão (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida albicans* ATCC 14053 e *Candida albicans* ATCC 90028. Isolados clínicos de *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*. E *Mycobacterium abscessos*.

2.6.2. Preparo das suspensões microbianas

Os micro-organismos foram inicialmente reativados a partir das suas culturas originais e mantidos em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) a 35°C por 24h para amostras bacterianas e 48h para amostras fúngicas. Posteriormente, cultivou-se as amostras em placas de Ágar Nutriente a 35°C pelo tempo descrito anteriormente. Colônias isoladas foi então ressuspensa em 3mL de solução fisiológica (NaCl 0.9 %) esterilizada até atingir uma turbidez equivalente na escala 0,5 de McFarland (1,5 x 10⁸ UFC/mL) (CLSI, 2013).

2.6.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição segundo a metodologia da diluição em caldo proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). As placas de 96 poços estéreis foram preparadas com 150µL de caldo BHI e 150µL do produto a ser testado seguido de diluições seriadas, cada inóculo de bactéria e fungo foi transferido para os poços e levados à estufa a 35°C por 24 horas (bactérias) e 48h (fungos), após o

período de incubação adicionou-se o revelador de crescimento resazurina a 0,1% e realizada a leitura após 4 horas de incubação. Foi utilizado no controle positivo de amostras bacteriana o cloranfenicol 0,02 mg/mL e para as amostras fúngicas, Nistatina 100.000 UI/mL. A CIM será a menor concentração da solução onde não houve crescimento bacteriano visível. (CLSI, 2013)

2.6.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Foram utilizadas as placas incubadas para determinação da CIM em meio líquido para determinação da CBM e CFM. Uma alçada de cada poço foi inoculada em placas de Ágar Müller Hinton e posteriormente incubadas em ambiente à 35°C por 24h/48h. As CBM's e CFM's foram consideradas para a menor concentração da solução onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9% de morte microbiana ou fúngica) (CLSI, 2013).

2.6.5. Controle de qualidade microbiológico

O extrato e bioprodutos foram diluídos na proporção 10^{-1} em solução NaCl 0.89% e posteriormente retirou-se 1,0 mL da solução para análise de contagem de micro-organismos heterotróficos pela técnica de Pour Plate em meio PCA (Himedia®), técnica dos tubos múltiplos pela inoculação de 1,0 mL da solução em meios Lauryl (Merck®), Verde brilhante (Coliformes totais) (Himedia®) e EC caldo (Coliformes termotolerantes) (Himedia®) respectivamente. Fez-se também a pesquisa para verificação de crescimento fúngico pela técnica de Spread Plate em meio Saboraud (Merck®), através da retirada de 100 uL da solução e espalhamento com alça de Dringalski na superfície do meio. As placas de PCA e Saboraud foram encubadas em estufa bacteriológica 37°C por 24 horas e até 48 horas para as placas de meio Sabourad. Os tubos múltiplos foram levados ao banho maria SI 150 (Solab®) em temperatura controlada de 37°C por 24 horas para os meios Lauryl e Verde brilhante e EC caldo 44, 5°C 24 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata para cada amostra analisada (BRASIL, 2010).

2.7. Avaliação da Atividade Irritativa frente à hemácias

2.7.1. 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.

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

O extrato e os bioprodutos de *Talisia esculenta* foram preparados 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 a suspensão de hemácias em 975µL de cada uma das diluições. 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 contra o branco (substância-teste diluída em PBS). Os resultados foram comparados com o tubo totalmente lisado pela água destilada que será utilizada como controle positivo.

2.7.3. Hemólise

A partir dos dados obtidos no estudo da IC₅₀, foram elaboradas as curvas dose-resposta referente ao extrato em estudo. As diluições (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), foram incubadas com 25µL 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.

2.7.4. Desnaturação (ID):

Foi preparada uma solução mãe do extrato de *Talisia esculenta* em PBS na concentração de 10mg/mL, foi adicionado 975 μ L da solução mãe em tubos, após adicionou-se 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 *Talisia esculenta* 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) (DINIZ, 2006). Equação para obtenção do Índice de Desnaturação

$$(ID)\% = (R_1 - R_i) / (R_1 - R_2) \times 100$$

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%.

2.8. Avaliação da Citotoxicidade

A viabilidade das células RAW 264.7 tratadas com o extrato de *Talisia esculenta* foi avaliada pelo ensaio colorimétrico baseado na redução do sal de tetrazólio, MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H tetrazólio) (SIGMA-ALDRICH) (MOSMANN, 1983). Para tal, as células (1×10^6 cel/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços e fundo chato, e incubadas por uma hora em meio RPMI, a 37 °C, com atmosfera contendo 5% de CO₂. Após esse período, as células foram tratadas com a concentração da CIM do extrato por 24 horas. Passado o tempo de incubação, foram adicionados 10 μ L de MTT (5 mg/mL) às culturas, e após 3 horas de incubação com o MTT foram acrescentados 100 μ L de SDS a 10%. A placa foi incubada *overnight* em

temperatura ambiente, livre da luz, para então ser feita a leitura da densidade óptica (DO), a 540 nm. Para determinação da viabilidade celular foi comparada com o grupo controle negativo, sem tratamento, e para controle positivo as células foram tratadas com Triton X-100.

2.9. 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 e Creme vaginal, com adaptações (Tabela 01).

O processo de obtenção das formulações farmacêuticas obtidas a partir do extrato das folhas de *Talisia esculenta* teve a patente requerida pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob o N° **Nº BR 10 2019 010186 5**

Tabela 01 – Componentes das formulações desenvolvidas a partir do extrato bruto de Pitomba: Creme aniônico 5% e Creme Vaginal 5%.

Creme aniônico 5%	Creme vaginal 5%
Glicerina	Propilenoglicol
Água destilada q.s.p.	Edetato dissódico
Álcool cetosteárico e Cetilesteárisulfato de sódio (9:1)	Água purificada q.s.p.
Óleo mineral	Estearato de octila
Cetiol	Cera autoemulsionante não iônica
Extrato 5% (50mg/mL)	Butil-hidroxitolueno
	Ciclometicona
	Extrato 5% (50mg/mL)

Fonte: Elaborado pelo autor (2019)

As formulações foram preparadas para obtenção de 100g. O creme vaginal teve seu pH ajustado para 4,5 com ácido láctico. Todas as formulações foram desenvolvidas com a ausência de conservantes normalmente utilizados na constituição dos excipientes.

2.10. Análise de estabilidade físico-química e controle de qualidade das formulações farmacêuticas

Foram realizados testes e adaptações em conformidade com a RDC nº 67, de 8 de Outubro de 2007 que dispõe sobre as Boas práticas de manipulação de preparações magistrais e Oficiais para uso humano, seguindo as normas preconizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

As análises com os testes citados abaixo foram realizadas com os bioprodutos logo após a formulação (t=0), 30 e 60 dias após a formulação (t=30 e t=60). No momento após a formulação os testes foram realizados em temperatura ambiente. Nos momentos t=30 e t=60, os testes de pH e características organolépticas foram realizados em 3 ambientes com condições de temperatura distintas: $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ (ambiente), $4.8\pm 2^{\circ}\text{C}$ (geladeira) e $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ (estufa) para todos os bioprodutos separadamente.

2.10.1 Teste de centrifugação

As amostras das formulações foram submetidas ao teste de estabilidade pelo método de centrifugação onde pesou-se 10g dos produtos e adicionados em tubos de ensaio cônico graduado e submetidos à rotação de 3.000 rpm (Fanem®, Excelsa Baby I) durante 30 minutos.

2.10.2. 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, 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) e 60 dias, nas mesmas condições.

2.10.3. 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 das formulações, 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), após o acondicionamento por 30 e 60 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.

2.10.4 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 e 60 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 anotada em cP (centipoise).

2.11. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias e foram analisados utilizando teste de Mann-Whitney. Todas as discussões estatísticas foram realizadas no nível de 95% ($p < 0,05$) de significância utilizando software GraphPad Prism 6.0.

3.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teor de Polifenóis

O teor de polifenóis totais obtido no extrato bruto de *Talisia esculenta* apresentou $0,12 \pm 0,06$ mg de ácido gálico/g de extrato. Neri-numa et al (2014) analisaram a polpa da pitomba onde o valor de polifenóis totais foi de $105,84 \pm 2,05$ mg de ácido gálico/g. O teor na casca e semente foi analisado por Souza (2016) encontrando $0,363 \pm 0,04$ mg e $0,091 \text{ mg} \pm 0,001 \text{ mg}$ respectivamente. Dessa forma, o teor de compostos fenólicos parece variar de acordo com o farmacógeno da planta.

3.2. Análise por LC-MS e FIA-ESI-IT-MS

A análise por LC-MS e FIA-ESI-IT-MS do extrato da folha da pitombeira mostrou a presença de diversos compostos como mostra a tabela 02:

Tabela 02 - Compostos identificados por LC-MS e FIA-ESI-IT-MS do extrato da folha de *Talisia esculenta* Radlk.

Nº	[M-H] ⁻	MS ⁿ	Componentes
1	191	167	Ácido Quínico
2	179	135	Ácido Cafeico
3	169	125	Ácido Galico
4	289	245, 205, 203, 179, 125, 109	Catequina
5	609	301	Rutina
6	283	268, 240, 151, 107	Acacetina
7	301	273, 257, 229, 179, 151	Quercitina

[M-H]⁻ (m/z): Massa por carga de íons; MSⁿ : Spectrometria da Massas de cada fragmento; NI: Fragmento Não Identificado. Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

O ácido quinico(1), caféico(2) e gálico(3) fazem parte da família dos ácidos fenólicos. Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos e caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila ou metoxila na molécula, que conferem propriedades biológicas, entre elas a antioxidante (SOARES, 2002).

Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma isolada, podem também se ligar entre si ou com outros compostos. A combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido caféico(2), o qual, associado ao ácido quínico, origina o ácido clorogênico, um dos fenóis mais biologicamente ativos (GARAMBONE et al, 2007).

O ácido clorogênico apresenta um amplo espectro de atividades biológicas, tais como: antioxidante, antimicrobiano, estimulante de utilização da glicose hepática, antipirética e anti-inflamatória (SCHWAB et al, 2001; FARAH et al 2005; GIRALDO et al 2007).

O ácido cafeico, também conhecido como ácido 3,4-diidroxicinâmico é um dos metabólitos mais amplamente distribuído em tecidos vegetais. Ele é normalmente encontrado como uma variedade de derivados incluindo amidas simples, ésteres, ésteres de açúcar e glicosídeos (FARAH et al 2005).

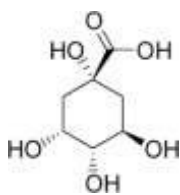
Os derivados do ácido cafeico na forma de ésteres e amidas possuem um amplo espectro de propriedades biológicas, entre elas a antioxidante e hepatoprotetora. A atividade antimicrobiana também é incluída, onde o ácido cafeico é utilizado em alimentos para inibir o crescimento de *Clostridium botulinum*. O complexo cafeico-lisozima possui ação contra *E. coli* e *S. aureus* (FARAH et al 2005).

A rutina, acacetina e quercitina são compostos que pertencem ao grupo dos flavonoides e apresentam uma série de atividades biológicas. A rutina (5) pertence à subclasse dos flavonóis e apresenta um dissacarídeo (raminose + glicose) ligados a posição 3 do anel pirano (BECHO, GUERRA, 2009). São descritas várias atividades biológicas para a rutina como sua atividade anticandida (HAN, 2009), efeito anticonvulsivante em ratos (NASSIRIASL, SHARIATI-RAD, ZAMANSOLTANI, 2008), efeito anti-inflamatório (GUARDIA et al., 2001) e antioxidante (OLIVEIRA, 2015)

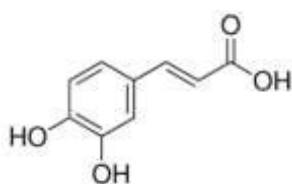
A quercetina é um flavonóide amplamente difundido na natureza cuja denominação é 2-(3,4-dihidroxifenil)3,5,7-trihidroxil-4H-1-benzo-piran-4-ona pela IUPAC (RICE-EVANS, MILLER, 1996). Além de sua capacidade antioxidante, a quercetina também apresenta propriedade antiviral, anti-inflamatória, antiproliferativa e antimicrobiótica (KAWAII et al., 1999). Neri-Numa et al., 2014 identificou alguns flavonoides como a miricetina e quercetina, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no extrato da polpa de pitomba.

Souza et al 2016 ao analisar a polpa da pitomba por LC-MS encontrou os mesmo compostos desse estudo, ácido quínico, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, entre outros.

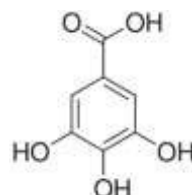
3.2. Desenho moléculas dos compostos identificados no extrato da folha de *Talisia esculenta*



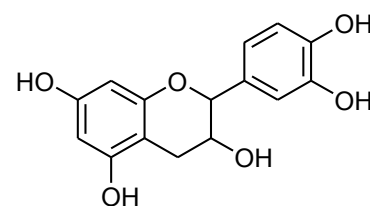
Ácido Quínico



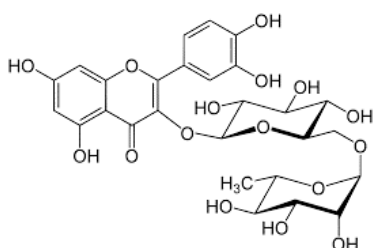
Ácido Cafeico



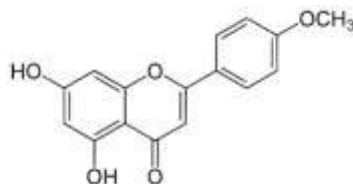
Ácido Galico



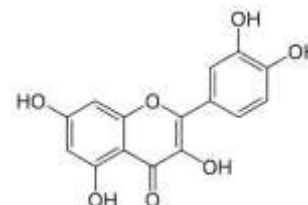
Catequina



Rutina



Acacetina



Quercitina

3.3. Atividade antioxidante do extrato de *Talisia esculenta* Radlk.

O extrato das folhas de *Talisia esculenta* foi testado frente a capacidade de seqüestrar o radical DPPH (Tabela 03), onde a porcentagem de inibição desse radical variou diretamente proporcional ao aumento da concentração do extrato, que aumentou de $1.46 \pm 0.13\%$ na concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para

18.41±0.18% na concentração de 50 µg.mL⁻¹, sendo esse último o pico máximo de de inibição do radical DPPH nas concentrações testadas de extrato.

Tabela 03 – Percentual de Atividade Antioxidante do extrato bruto das folhas de *Talisia esculenta* Radlk.

CONCENTRAÇÃO (µg.mL ⁻¹)	TEMPO (min)		
	1 min	10 min	20 min
5 µg.mL ⁻¹	1.46±0.13	1.15±0.06	0.95±0.08
10 µg.mL ⁻¹	5.31±0.06	4.48±0.22	3.33±0.02
25 µg.mL ⁻¹	11.55±0.47	11.15±0.38	10.78±0.53
50 µg.mL ⁻¹	18.41±0.18	17.68±0.33	17.52±0.22

Valores médios ± desvio padrão. Fonte: Elaborado pelo autor (2019)

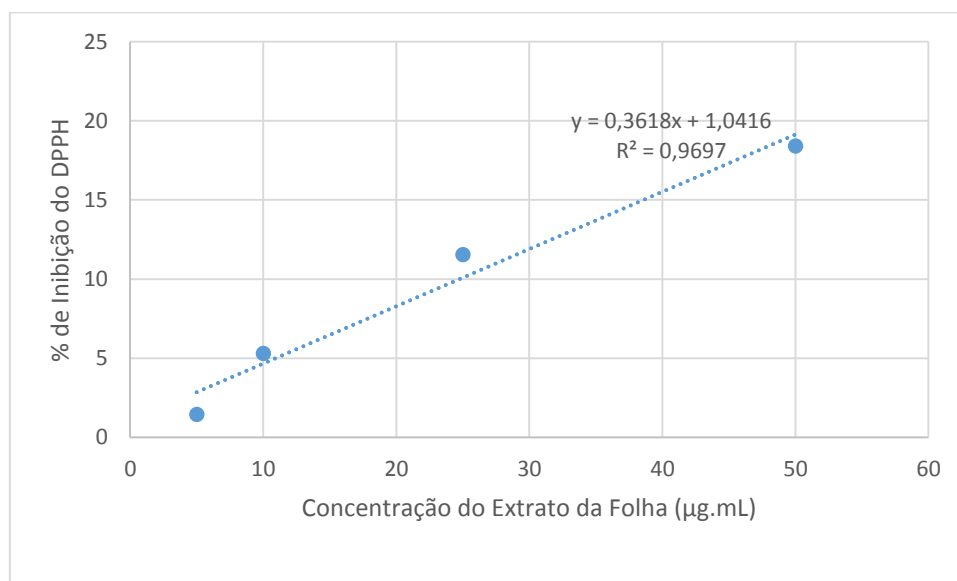
A ação antioxidante está intimamente ligada aos compostos presentes no extrato da folha, sobretudo os flavonoides, que são os metabólitos mais ativos nessa atividade. A alta atividade antioxidante da quercetina, por exemplo, se deve a habilidade de impedir os processos radiculares nas células através ação seqüestradora de O₂, pela reação com radicais peroxil, inibindo assim a peroxidação lipídica e pela ação quelante de ferro diminuindo a formação de OH⁻ (JOVANOVIC et al., 1994). A rutina também apresenta importante atividade antioxidante que se deve ao fato de poder atuar como sequestradora de O²⁻ e quelante de ferro (GRINBERG et al., 1994).

A correlação entre a atividade antioxidante do extrato da folha (%) e a concentração de extrato (Gráfico 1) utilizada apresentou a equação da reta $y=0.3618x+1.0416$ ($R^2=0.9697$) que corresponde a uma alta correlação dose resposta. A CE₅₀ para o extrato foi de 4.37 µg.mL⁻¹ que é a concentração de extrato necessária para atingir 50% de atividade. Neri-Numa (2014) ao estudar a polpa da pitomba encontrou uma CE₅₀ de 9.56 µg.mL⁻¹. Esses resultados foram superiores ao apresentado pelo antioxidante padrão BHT (CE50 de 70,11 µg.mL) (NAVES, 2014)

JUNIOR e colaboradores ao testar a capacidade antioxidante pelo método do DPPH das cascas do fruto *Nephelium lappaceum* L., espécie vegetal também da família Sapindaceae e conhecida como Rambutã,

observaram que o mesmo possui $CE_{50} = 373,72 \mu\text{g/mL}$. Esses frutos também apresentam compostos fenólicos (taninos e flavonoides) que são responsáveis por essa ação biológica, tal como no extrato de *Talisia esculenta*

Gráfico 1 – Relação entre a porcentagem de inibição do DPPH *versus* a concentração do extrato da folha de *Talisia esculenta* Radlk



Fonte: Elaborado pelo autor

3.4 Controle de Qualidade Microbiológico do extrato bruto e Bioprodutos manipulados

Os padrões de qualidade microbiológicos foram avaliados para o extrato bruto da pitomba e bioprodutos derivadas do extrato (creme aniônico 5% e creme vaginal 5%) logo após a elaboração dos mesmos, observando-se ausência de quaisquer contaminantes conforme a tabela 04.

Os limites de contaminação microbiológica são estipulados pela Farmacopeia Brasileira para a qualidade microbiológica de formulações fitoterápicas de até $\leq 10^3$ UFC/mL para fungos e 3×10^2 UFC/mL para bactérias (ANVISA, 2012).

Tabela 04 - Controle de qualidade microbiológico do extrato bruto e das formulações de *Talisia esculenta* Radlk. (após elaboração/T=0)

	Análise presuntiva	Micro-organismos Heterotróficos	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes	Análise fúngica
Produtos	Caldo Lauryl	Plate Count Agar	Verde brilhante	Caldo EC	Ágar Sabourad
Extrato bruto	-	-	-	-	-
Creme aniônico 5%	-	-	-	-	-
Creme vaginal 5%	-	-	-	-	-

(-):ausência de micro-organismos. Fonte: elaborado pelo autor (2019)

3.5. Atividade antimicrobiana do extrato da folha de *Talisia esculenta* Radlk..

O extrato foi ressuspendido em água estéril e testados na concentração de 100mg/mL, frente a cepas de bactérias e a micobactéria *Mycobacterium abscessos* (Tabela 05).

Tabela 05 - Atividade antibacteriana do extrato das folhas de *Talisia esculenta* Radlk. na concentração de 100mg/mL

Micro-organismo	CIM	CBM	CN
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25mg/mL	-*	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-*	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25mg/mL	-*	-
<i>Mycobacterium abscessos</i>	12,5 mg/mL	-*	-

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; CN: Controle Negativo (Cloranfenicol 0,1%); (-): ausência de crescimento bacteriano. (-*): Ausência de CBM.

O extrato da folha de pitomba inibiu o crescimento de todas as cepas de bactérias testadas, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa*, que não apresentou sensibilidade ou é resistente ao extrato. As CIM 's variam entre 12,5mg/mL e 25mg/mL, onde *Mycobacterium abscessos* apresentou a melhor CIM. Esses micro-organismos são grande interesse clínico, visto que são as principais causadoras de infecções em vários sítios do organismo humano.

O extrato da folha tem potencial para se tornar uma nova alternativa terapêutica frente aos *M. abscessos*, visto que essa micobactéria é de crescimento rápido e responsável por várias infecções de tecidos moles. Esse micro-organismo possui resistência intrínseca e adquirida a alguns fármacos comumente usados no tratamento. A resistência intrínseca é atribuída a uma combinação da barreira de permeabilidade do complexo envelope celular de múltiplas camadas, sistemas de exportação de medicamentos, alvos de antibióticos com baixa afinidade e enzimas que neutralizam antibióticos no citoplasma. (NESSAR et al 2012)

Até o momento, a resistência adquirida do *M. abscessos* foi observada apenas para aminoglicosídeos e macrólídeos, que é conferido por mutações que afetam os genes que codificam os alvos do antibiótico. Com isso, necessita-se com urgência de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de males causados pelo *M. abscessos*. (NESSAR et al 2012)

As pesquisas com atividade antibacteriana com *Talisia esculenta* são bastante escassos, a quase totalidade está restrito a estudos etnobotânicos. Alguns desses mostram que a *Talisia esculenta* é utilizada para tratar infecções de bactérias gram-positivas no trato digestório. (MATHABE et al 2006; YASUNAKA et al 2005).

O extrato mostrou atividade antimicrobiana tanto em cepas gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) quanto em gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922), sugerindo atividade inibitória de amplo espectro. O extrato não possuem CBM, conferindo atividade bacteriostática

Nos testes realizados com fungos (Tabela 06), o extrato da folha inibiu o crescimento de todas as cepas. A *Candida albicans* ATCC 90028 foi a cepa mais sensibilizada com o extrato da folha, cuja CIM foi 3,125 mg/mL, seguido

pela *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, cujas CIM's foram 6,25mg/mL. O extrato não obteve valor de CFM, sugerindo assim atividade fungistática.

O extrato dessa forma também é bastante eficaz frente a uma cepa de importante interesse clínico (*Candida albicans*), cuja causa infecções principalmente em mulheres, tais como a candidíase (vulvovaginal e oral) que, são consideradas as duas formas mais comuns de infecções fúngicas oportunistas (FIDEL, 2002). Numerosos estudos indicam que *C. albicans* é mais freqüente do que as espécies de não *C. albicans*, respondendo por 80 a 90% dos casos (DAN et al 2002; MARTENS et al 2004).

Entretanto, nos últimos anos, tem-se observado um aumento na freqüência das espécies de não *C. albicans*, principalmente *C. glabrata* e *C. krusei* (FERRAZZA et al 2005; OZCAN et al 2006).

SANTOS et al 2010 ao avaliar a atividade antimicrobiana de *Dilodendron bipinnatum* (Sapindaceae), frente à *C. albicans* observou uma atividade moderada de inibição de crescimento do fungo.

Tabela 06 – Atividade antifúngica do extrato da folha de *Talisia esculenta* Radlk. na concentração de 100mg/mL

Micro-organismo	CIM	CFM	CN
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	6,25mg/mL	-*	-
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	6,25mg/mL	-*	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	12,5mg/mL	-*	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	3,125mg/mL	-*	-
<i>Candida parapsilosis</i> IC	50mg/mL	-*	-
<i>Candida glabrata</i> IC	12,5 mg/mL	-*	-
<i>Candida albicans</i> IC	12,5mg/mL	-*	-

<i>Candida tropicalis</i> IC	50mg/mL	-*	-
---	---------	----	---

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima; CN: Controle Negativo (Nistatina 100.000UI); (-): ausência de crescimento fungico. (-*): Ausência de CFM.

Freire (2001) reportou em seu estudo que lectinas extraídas da semente de *Talisia esculenta* foram capazes de inibir o crescimento de *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Um possível mecanismo para essa atividade está relacionada aos flavonoides que tem sido identificados e caracterizados como agentes antifúngicos, antivirais e antibacterianos (TAGURI, 2004). O extrato da folha de *Talisia esculenta* como demonstrado nas análises por LC-MS anteriormente apresentam 3 flavonóides.

Estudos também mostram que existe um sinergismo desses compostos com outras moléculas antimicrobianas. Ao correlacionar a atividade antibacteriana com a estrutura molecular dos flavonóides em seu nível estrutural, Taguri (2004) mostrou que os flavonoides tem potencial contra o crescimento desses micro-organismos.

Um possível mecanismo para a ação antimicrobiana é a capacidade do flavonóide de interação com a membrana plasmática, inibindo sua função, e conseqüentemente levando a destruição da integridade celular. Alguns flavonoides também podem inibir a atividade de DNA girase, e outros podem inibir o metabolismo energético bacteriano (CUSHNIE, LAMB, 2006)

Os flavonóides tem sido empregados experimentalmente em conjunto com alguns antibióticos sintéticos conhecidos como amoxicilina, clavulina e ampicilina e os resultados mostram que a ação antibacteriana destes antibióticos foi potencializado. Essa combinação com antibióticos convencionais pode ser uma nova estratégia para o desenvolvimento de terapias contra bactérias (LIN et al., 2005).

3.6. Atividade antimicrobiana dos bioprodutos manipulados a partir do extrato da folha de *Talisia esculenta* Radlk.

O creme aniônico 5% formulado com o extrato da folha foi testado frente a quatro micro-organismos (Tabela 07). *E. coli* e *S. aureus* apresentaram o mesmo valor de CIM (25mg/mL), seguido por *C. albicans* que obteve o melhor valor de CIM (12,5mg/mL) para o creme da folha

A ineficácia do extrato contra *P. aeruginosa* pode estar relacionado a membrana externa da bactéria que representa uma barreira contra substâncias ativas presentes no extrato oriundos de plantas medicinais (URZUA et al., 1998).

Batista et al 2012 testou cremes formulados à base *Mauritia flexuosa* L. em infecções por bactérias gram-positivas e negativas em ratos e constatou que o creme inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, mas não inibiu *E. coli*.

Nesse sentido, o creme 5% pode ser útil no tratamento de infecções de pele de maneira direto ou associada com outros fármacos, visto que é o órgão mais acessível e exposto do corpo humano, sendo, portanto, um dos órgãos mais sujeitos a infecções. *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são exemplos de micro-organismos da microbiota transitória da pele. Uma lesão ou ferimento se tornam propícios ao surgimento de infecções oportunistas por essas bactérias. (PIGNATARI, A.C.C., MAMIZUCA, E.M, 2013).

Tabela 07 – Atividade antimicrobiana dos cremes aniônicos 5% formulados com o extrato da folha de *Talisia esculenta* Radlk

	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>C. albicans</i> (ATCC14053)		CN
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CFM	
Creme									
aniônico 5%	25 mg/mL	-*	-	-*	25 mg/mL	-*	12,5mg/mL	-**	-

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima; CN: Controle Negativo (Base do creme); (-): ausência de crescimento fungico. (-*): Ausência de CBM. (-**): Ausência de CFM. Fonte: Elaborado pelo autor (2019)

O creme vaginal 5% elaborado com o extrato da folha de *Talisia esculenta* foi testado frente a fungos padrão (Tabela 08) e de isolados clínicos (Tabela 09). O creme vaginal 5% da folha apresentou valores de CIM que variaram entre 6,25mg/mL a 50mg/mL. A ação dos bioprodutos é fungistática devido a ausência de CFM.

Os resultados mostram que o creme vaginal é eficiente no tratamento de infecções fúngicas como a candidíase, podendo ser utilizados também em associação com fármacos já comumente usados.

A candidíase é uma das causas mais comuns de infecção do trato genital feminino. É caracterizada por apresentar um exsudato branco, cuja principal manifestação é o prurido vulvar intenso, causado pela produção de micotoxinas (MURRAY, 2002).

Segundo Galle e Gianinni (2004), candidíase é a segunda causa mais freqüente de vulvovaginite em mulheres na idade adulta. Estudos mostram que 75% das mulheres terão, pelo menos, um episódio de candidíase vulvovaginal ao longo de suas vidas.

O número de fármacos para o tratamento das infecções fúngicas é relativamente pequeno; isto decorre do fato de que os fungos são organismos eucariotos o que dificulta o desenvolvimento de compostos específicos para células fúngicas (MURRAY et al., 2002). E somado a isso o surgimento de cepas resistentes, principalmente às substâncias azólicas, tem dificultado a terapêutica da candidíase. Dessa forma novas alternativas terapêuticas, como o extrato de *Talisia esculenta* são necessários.

A *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) foi a cepa mais sensível entre os fungos padrões. Essa espécie de *Candida* é a segunda espécie mais freqüentemente isolada dos pacientes. Além de ser altamente prevalente, sua biologia difere marcadamente da *C. albicans*. (GUNTHER et al 2014)

Nas últimas décadas, a prevalência combinada de espécies de *Candida* não-*albicans* superou as infecções por *Candida albicans* em várias regiões em todo o mundo. Destaca-se assim a necessidade de desenvolver um tratamento eficaz e prevenir futuros surtos. (GUNTHER et al 2014)

Bittencourt 2008 em seu trabalho desenvolveu cremes vaginais utilizando como base o creme Lanette® à base de própolis vermelha frente à cepas de *C. albicans*. A formulação inibiu o crescimento do fungo apresentando halo de inibição em torno de 16 mm.

A ação anti-fúngica pode estar relacionado com os flavonoides, cujos tem sido identificados e caracterizados como agentes antifúngicos (TAGURI, 2004).

Tabela 08 – Atividade antifúngica do creme vaginal formulado com o extrato da folha frente a fungos padrão.

	<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)		<i>C. krusei</i> (ATCC 6258)		<i>C. albicans</i> (ATCC 14053)		<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)		CN
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	
Creme vaginal 5%	6,25 mg/mL	-*	50 mg/mL	-*	12,5 mg/mL	-*	50mg/mL	-**	-

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima; CN: Controle Negativo (Base do creme vaginal); (-): ausência de crescimento fungico. (-*): Ausência de CFM. Fonte: Elaborado pelo autor (2019)

Para as cepas de isolados clínicos (Tabela 09) o creme vaginal do extrato da folha apresentou valores de CIM's que variaram entre 12,5mg/mL e 50mg/mL. O melhor de CIM foi para a *C. glabrata*. O creme vaginal da folha nesse sentido apresenta melhor sensibilização de isolados clínicos.

Os cremes aniônicos são as melhores bases para formulações de uso prolongado por possuírem alta permeação na pele (KEMPFER, 2010). As diferenças dos valores entre o extrato bruto e as formulações podem ser decorrentes de uma difusão não tão eficiente das moléculas ativas do extrato nas bases utilizadas para os bioprodutos.

Tabela 09 – Atividade antifúngica do creme vaginal formulado com o extrato da folha frente a fungos de isolados clínicos.

	<i>C. parapsilosis</i> (IC)		<i>C. glabrata</i> (IC)		<i>C. albicans</i> (IC)		<i>C. tropicalis</i> (IC)		CN
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	
Creme vaginal 5%	50 mg/mL	-*	12,5 mg/mL	-*	25 mg/mL	-*	50 mg/mL	-*	-

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima; CN: Controle Negativo (Base do creme vaginal); (-): ausência de crescimento fungico. (-*): Ausência de CFM. Fonte: Elaborado pelo autor (2019)

3.7. Avaliação da atividade hemolítica do extrato bruto da folha de *Talisia esculenta* Radlk.

Os valores de IC₅₀, expressos em mg/mL, representam a concentração do extrato necessária para causar 50% de hemólise (H₅₀) em hemácias sadias. O índice de desnaturação (ID) e a razão H₅₀/ID possibilitam classificar o produto quanto ao seu potencial irritativo de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 10 – Valores padrão de classificação do potencial irritativo

IN VIVO	IN VITRO (H ₅₀ /ID)
Não Irritante	>100
Irritante Leve	≥10
Irritante Moderado	≥1
Irritante Severo	≥0.1
Irritante Máximo	≤0.1

Os valores dos índices citados acima para o extrato foram:

Tabela 11 - Valores de H₅₀, ID e razão H₅₀/ID do extrato das folhas de *Talisia esculenta* Radlk. e das bases utilizadas para manipulação dos bioprodutos

Produto	H₅₀	ID(%)	H₅₀/ID	Nível de Irritabilidade
Extrato da Folha	471,25	1,26	371,73	NI
Base – creme aniônico	ND	ND	ND	NI
Base – creme vaginal	ND	ND	ND	NI

H₅₀ - dose efetiva que causa 50% de hemólise; ID – Índice de Desnaturação; H₅₀/ID – razão utilizada para classificação do potencial de irritação; NI – Não Irritante ND – Não determinado;

O resultado do extrato bruto para a relação HD₅₀/ID indica que os mesmos possuem baixa taxa de hemólise, resultando em uma baixa toxicidade não gerando irritabilidade às hemácias. As informações das bases dos bioprodutos sobre ação hemolítica/irritativa foram consideradas as constantes em bula.

3.8. Análise de estabilidade e controle de qualidade dos bioprodutos

Por apresentarem propriedades reconhecidamente terapêuticas, os fitoterápicos, e mais comumente, os extratos vegetais, vêm sendo incorporados em formulações dermatológicas. Contudo, em relação ao controle de qualidade, a inserção destes insumos vegetais ativos em fórmulas magistrais ou industriais, requer maior controle de qualidade e padronização na produção destas formulações, ressaltando a importância das características físico-químicas destes produtos (Pianovski, 2008).

A estabilidade dos bioprodutos foi analisada no momento em que foram produzidos e nos primeiros 30 e 60 dias pós-produção em variadas condições de temperatura para observar o comportamento físico e químico das formulações.

O creme aniônico apresentou valor de pH semelhante e compatíveis com o pH da pele. As características organolépticas mostram características já esperadas para o extrato e para os bioprodutos: aspecto e textura cremosa,

com odor característico, coloração característica uniforme. O Teste de centrifugação demonstrou que as formulações permaneceram estáveis fisicamente após o teste, sem alteração de cor, mudança de fase e formação de precipitação.

O creme vaginal teve seu pH corrigido para 4,5 após a formulação cujo apresentou características organolépticas compatíveis para o bioproduto. Após o teste de centrifugação as formulações também permaneceram inalteradas.

Tabela 12 - Testes de controle de qualidade dos bioprodutos logo após a formulação em temperatura ambiente

Bioprodutos	pH	Características Organolépticas	Centrifugação	Viscosidade
Creme aniônico 5%	6,0	Cremoso, com odor característico, coloração esverdeada e uniforme.	Manutenção de características iniciais (cremoso) e ausência de alteração de cor ou mudança de fase e ausência de precipitação	34801 cPs
Creme Vaginal 5%	4,5	Cremoso, com odor característico, coloração esverdeada uniforme.	Manutenção de características iniciais (cremoso) e ausência de alteração de cor ou mudança de fase e precipitação	31661 cPs

Fonte: elaborado pelo autor (2019)

Após 30 dias o creme aniônico (Tabela 13) apresentou variações de pH, onde o ambiente frio (geladeira) teve a maior variação (pH=6,5). A viscosidade também apresentou variação de valor, indicando que o bioproduto ficou mais viscoso. Após 60 dias (Tabela 13) observou-se novas variações de pH, onde o ambiente frio teve novamente a maior variação (pH= 6,9). Temperaturas baixas parece ser o principal fator para o aumento do pH do creme aniônico da folha.

Gelaleti et al 2019 ao estudar a estabilidade de formulações dermatológicas contendo extrato de *Pelargonium graveolens* observou que o pH ficava mais ácido no ambiente da geladeira, onde ao longo de 90 dias, o pH chegou ao valor de 4,21.

O ambiente da estufa não apresentou variação de pH após 60 dias, indicando que a formulação mantém em pH estável em altas temperaturas por longos períodos. Considerando que vivemos em região tropical com

temperaturas na maior parte do tempo acima de 30°, as formulações possivelmente se manterão estáveis ao clima nordestino.

O teste de centrifugação mostrou que mesmo após 60 dias a formulação se manteve íntegra e estável fisicamente em temperatura ambiente. Isso pode estar relacionado à qualidade das matérias primas. A textura da formulação nesse momento apresenta-se menos firme e mais fluida.

O teor de polifenóis também apresentou pouca variação de quantidade, o que sugere que o bioproduto mantém suas propriedades biológicas, como a antioxidante e a atividade antimicrobiana eficazes e preservadas por longos períodos. Montagner & Frasson (2007) em seu estudo de estabilidade com formulações a base de hidroquinona constataram que a base aniônica e a associação dos antioxidantes metabissulfito de sódio a 0,1 % e vitamina E a 0,5 % foi o sistema que se manteve quimicamente estável por maior período de tempo, a hidroquinona. A base dos cremes de *Talisia esculenta* (aniônico) desse estudo também podem ser responsáveis pela estabilidade dos polifenóis.

Tabela 13 - Avaliação da estabilidade após 30 e 60 dias do creme aniônico 5% à base do extrato bruto da Folha de *Talisia esculenta* Radlk.

	30 dias			60 dias		
	21±2°C (ambiente)	4.8±2°C (geladeira)	37±2°C (estufa)	21±2°C (ambiente)	4.8±2°C (geladeira)	37±2°C (estufa)
Ph	6,3	6,5	6,3	6,4	6,9	6,3
Características Organolépticas	Creimoso; odor característico; coloração esverdeada uniforme	Creimoso e firme; odor característico; coloração esverdeada uniforme	Creimoso e levemente fluido; odor característico; coloração esverdeada uniforme	Creimoso; odor característico; coloração esverdeada uniforme	Creimoso e firme; odor característico; coloração esverdeada uniforme	Creimoso e fluido; odor característico; coloração esverdeada uniforme
Centrifugação	Manutenção de características iniciais (creimoso); ausência de alteração de cor/mudança de fase; ausência de precipitação	-	-	Manutenção de características iniciais (creimoso); ausência de alteração de cor/mudança de fase; ausência de precipitação	-	-
Viscosidade	34801 cPs	-	-	35245 cPs	-	-

Teor de Polifenóis Totais (mg de ácido gálico/g de extrato seco)	0,115±0,06	-	-	0,112±0,06	-	-
--	------------	---	---	------------	---	---

(-):Não testado. Fonte: Elaborado pelo autor (2019)

Alguns estudos de estabilidade com formulações incorporadas de extratos vegetais mostram que o pH em temperaturas baixas apresentam pouca ou nenhuma alteração, o que indica que as alterações de pH dos bioprodutos possam ser uma característica particular do extrato da pitomba (GARCIA et al 2009; SOUSA, FERREIRA 2010; VELASCO et al 2008).

O comportamento físico-químico do creme vaginal foi semelhante aos demais. Temperaturas altas não provocaram alteração de pH importante em nenhum dos cremes vaginais. Dessa forma, esses bioprodutos não provocaram alterações no microambiente da vagina no que se refere à mudanças de pH em temperaturas altas.

Os valores de pH dessa formulação também variaram com baixas temperaturas nos períodos de tempo avaliados. As demais características da formulação permaneceram estáveis. A textura também apresentou variação com as temperaturas.

Tabela 14 - Avaliação da estabilidade após 30 e 60 dias do creme vaginal 5% à base do extrato bruto da Folha de *Talisia esculenta* Radlk.

	30 dias			60 dias		
	21±2°C (ambiente)	4.8±2°C (geladeira)	37±2°C (estufa)	21±2°C (ambiente)	4.8±2°C (geladeira)	37±2°C (estufa)
Ph	4,5	4,7	4,5	4,5	4,9	4,6
Características Organolépticas	Cre moso; odor característico; coloração esverdeada uniforme	Cre moso e firme; odor característico; coloração esverdeada uniforme	Cre moso e levemente fluido; odor característico; coloração esverdeada uniforme	Cre moso; odor característico; coloração esverdeada uniforme	Cre moso e firme; odor característico; coloração esverdeada uniforme	Cre moso e fluido; odor característico; coloração esverdeada uniforme

Centrifugação	Manutenção de características iniciais (cremoso); ausência de alteração de cor/mudança de fase; ausência de precipitação	-	-	Manutenção de características iniciais (cremoso); ausência de alteração de cor/mudança de fase; ausência de precipitação	-	-
Viscosidade	31661 cPs	-	-	32359cPs	-	-
Teor de Polifenóis Totais (mg de ácido gálico/g de extrato seco)	0,12±0,06	-	-	0,118±0,06	-	-

(-):Não testado. Fonte: Elaborado pelo autor (2019)

3.9. Avaliação da Citotoxicidade

As análises de toxicidade celular obtidos mostraram que o extrato da folha de *Talisia esculenta* Radlk. não se apresenta tóxica à cultura de células testada (macrófagos humanos), sendo essas diferentes estatisticamente ao controle positivo. Em 24horas de tratamento o extrato das folhas de *Talisia esculenta* apresentou uma toxicidade de 1,80% na concentração de 12,5mg/mL.

A amostra é considerada citotóxica apenas quando o percentual de viabilidade das células expostas é inferior a 70% (TEIXEIRA et al., 2005; CERQUEIRA et al., 2008).

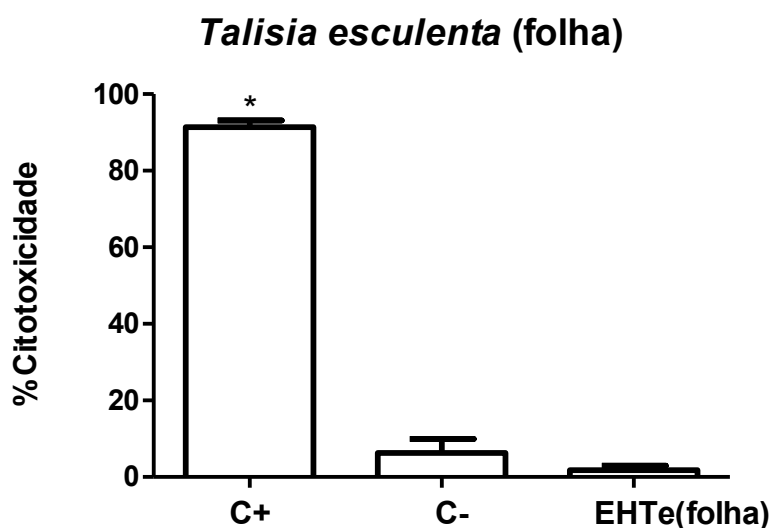


Gráfico 3 - Toxicidade do extrato da folha de *Talisia esculenta* em macrófagos humanos. Dados expressos em média \pm desvio padrão do percentual de citotoxicidade para quatro indivíduos em triplicata; * $p < 0,05$, para o teste de Mann-Whitney, comparado ao controle positivo. C+: Controle positivo; CN: Controle negativo; EHTe: Extrato hidroetanólico de *Talisia esculenta*.

Esses resultados corroboram com o estudo de Fraga (2018) que avaliou a atividade citotóxica da polpa e casca de *Talisia esculenta* em culturas de células de fibroblastos onde a viabilidade celular permaneceu acima de 80% para ambos os extratos.

Ventura et al 2006 ao estudar a citotoxicidade em células animais induzida pela ação da lectina de sementes de *Talisia esculenta* em células vero (rim de macaco verde africano) observou que as células tratadas com a lectina tiveram perda da integridade da membrana plasmática, retração celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos.

Ressalta-se que a avaliação da citotoxicidade é fundamental para estabelecer o quanto os bioprodutos podem ser tóxicos para uma determinada célula. Assim, os resultados obtidos por meio deste, podem ser analisados para definir a possibilidade de ensaios in vivo, estabelecendo uma margem de segurança para o produto.

4.0. Conclusão

Dessa forma o extrato bruto das folhas de *Talisia esculenta* Radlk possuem fitocomponentes que possuem relação direta com as atividades biológicas testadas, visto que são relatadas na literatura. A atividade antioxidante apresenta ação superior a de antioxidantes padrões e é diretamente proporcional à concentração do extrato e relacionada com os compostos fenólicos identificados por LC-MS. O extrato e os bioprodutos derivados apresentaram importante atividade antimicrobiana com micro-organismos de importância clínica para o ser humano. A atividade hemolítica comprovou-se que o extrato e bioprodutos não são irritativos as hemácias. E que o extrato bruto não é tóxico à células testadas, entretanto novos estudos são necessários com outras culturas de célula. Os bioprodutos mostraram-se

potencialmente viáveis no desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de doenças infecciosas e apresentaram boa estabilidade físico-química-microbiológica que assegura a qualidade e eficácia dos mesmos.

REFERENCIAS

ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P.; WURDACK, K.J.; FERRUCCI, M.S.; JOHNSON, G.; DIAS, P.; COELHO, R.G.; SOMNER, G.V.; STEINMANN, V.W.; ZIMMER, E.A.; STRONG, M.T. Generic relationships and classification of Tribe Paullinieae (Sapindaceae) with a new concept of Supertribe Paulliniodae. *Systematic Botany*, v.42, n.1, p.96-114, 2017.

BATISTA, J. S. et al. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L.. *Cienc. Rural* [online]. 2012, vol.42, n.1, pp.136-141. (<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011005000155>).

BECHO, J. R. M., MACHADO, H.*, GUERRA, M. O.*. RUTIN – STRUCTURE, METABOLISM AND PHARMACOLOGICAL POTENCY. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, v. 1, n. 1, p. 21 - 25, 2009

BFG. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, v.66, n.4, p.1085-1113, 2015.

BITTENCOURT, F. O.. Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha. Dissertação de Mestrado, Universidade Tiradentes. Aracaju Março – 2008

BRASIL. 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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário nacional da farmacopeia brasileira. 2.ed. Brasília: ANVISA, 2012.

CERQUEIRA, F., CIDADE, H., UFFORD, L., BEUKELMAN, C., KIJJOA, A., NASCIMENTO, M.S.J. The natural prenylated flavone artelastin is na inhibitor of ROS and NO production. *International Immunopharmacology* , 8, 597–602. 2008.

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

- CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4- quinolone resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*. 13 (3), 187-91. 2006
- DAN, M., POCH, F., LEVIN, D. High rate of vaginal infections caused by non-*C. albicans* species among asymptomatic women. *Med Mycol*. 2002;40(4):383-6.
- DINIZ, LÚCIO RICARDO LEITE. Efeito das saponinas triterpênicas isoladas de raízes da *Ampelozizyphus amazonicus Ducke* sobre a função renal. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, UFMG. 2006.
- FARAH A, PAULIS T, TRUGO LC, MARTIN P R. Effect os roasting on the fortamion of clorogenic acid lactones in coffee. *J. of Agric and Food Chemistry*, v. 53, p. 1505-1513, 2005. (DOI: 10.1021/jf048701t)
- FERRAZZA, M. H. S. H.; MALUF, M. L. F., CONSOLARO, M. E. L., SHINOBU, C. S., SVIDZINSKI, T. I. E., BATISTA, M. R. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005;27(2):58-63.
- FIDEL, P.L. Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. *Med Mycol*. 2002;40(4):359-75.
- FRAGA, Layanne Nascimento. Compostos bioativos, capacidade antioxidante e citotoxicidade da casca e polpa da pitomba (*Talisia esculenta* (ST. HIL.) RALDK). 2018. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição)-Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2018.
- FREIRE, M. et al. Structural insights regarding an insecticidal *Talisia esculenta* protein and its biotechnological potential for *Diatraea saccharalis* larval control. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, v. 161, n. 1, p. 86-92, 2012.
- GALLE, L. C.; GIANINNI, M. J. S. M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 40, n.4, p. 229-236, 2004.
- GARAMBONE, E., ROSA, E. G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. *Alim e Nut Araraquara*, v. 18, n.2, p.229-235, 2007
- GARCIA, C. C., GERMANO, C., OSTI, N. M., CHORILLI, N. Development and evaluation of physical-chemistry stability of formulations of intimate liquid soap with tea tree oil. *Rev. Bras. Farm.*, 90(3): 236-240, 2009
- GIRALDO, L.; LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; BAROUH, N.; BARÉA, B.; VILLENEUVE, P. Lipase-catalyzes synthesis os chlorogenate fatty esters in solvante-free médium. *Enzyme Microb. Tech*. 2007, 41, 721-726
- GRINBERG, L. N.; RACHMILEWITZ, E. A.; NEWMAN, H. . Protective effects of rutin against hemoglobin oxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 48, 643-649. 1994.

GUNTHER, L. S. A. et al. Prevalência de *Candida albicans* e não *albicans* isoladas de secreção vaginal: avaliação comparativa entre colonização, candidíase vaginal e candidíase vaginal recorrente em mulheres diabéticas e não diabéticas. *Sao Paulo Med. J.* [online]. 2014, vol.132, n.2, pp.116-120. (<http://dx.doi.org/10.1590/1516-3180.2014.1322640>).

JOVANOVIC, S. V.; STEENKEN, S.; TOSIC, M.; Marjanovic, B. And Simic, M. G. Flavonoids as antioxidant. *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 846-853. 1994.

KAWAII, S.; TOMONO, Y; KATASE, E.; OGAWA, K.; YANO, M. Antiproliferative activity of flavonoids and several cancer cell lines. *Biosc. Biotech. Biochem.* 63 (5), 896-899. 1999

KEMPFER, C. B., HÖRNER, R., TIZOTTI, M. K., MARTINI, R, RODRIGUES, M. A., KUHN, F. T., MAYER, L. E., ROEHRS, M. C. S. M.. Culturas de secreções de pele: estudo de prevalência e sensibilidade aos antimicrobianos em um hospital universitário. *Revista Saúde (Santa Maria)*, v. 36, n.1, Jan./jun. 2010. (DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/223658342452>)

LIN, R. D.; CHIN, Y.P.; LEE, M.H. Antimicrobial activity of antibiotics in combination with natural flavonoids against clinical extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Phytother Res.* 19 (7), 612-7. 2005.

MARTENS, M.G., HOFFMAN, P., EL-ZAATARI, M. Fungal species changes in the female genital tract. *J Low Genit Tract Dis.* 2004;8(1):21-4.

MATHABE, M.C., NIKOLOVA, R.V., LALL, N., NYAZEMA, N.Z. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. *Journal of Ethnopharmacology.* 2006;105:286-293.

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

SOUZA, M. P. Caracterização química e avaliação do potencial antioxidante dos frutos mari-mari (*Cassia leiandra*), pajurá (*Couepia bracteosa*) e pitomba (*Talisia esculenta*). Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS. 2016

MONTAGNER, D., FRASSON, A.P.Z. Avaliação da estabilidade de cremes contendo hidroquinona a 2% após longo período de armazenamento por meio do teor e características físicas. *Rev Rx* 2007; 1:35-8.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan 4. ed. 2002. 762 p.

NASSIRI-ALS, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTAN, F., Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 32, p. 989-993, 2008.

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.

NERI-NUMA, I. A., CARVALHO-SILVA L. B., FERREIRA, J. E. M., MACHADO, A. R. T., MALTA, L. G., RUIZ, A. L. T. G., CARVALHO, J. E., & PASTORE, G. M. (2014). "Preliminary evaluation of antioxidant, antiproliferative and antimutagenic activities of pitomba (*Talisia esculenta*)". Food Science and Technology, 59, 1233- 1238.

NESSAR, R., CAMBAU, E., REYRAT, J. M., MURRAY, A., GICQUEL, B. Mycobacterium abscessus: a new antibiotic nightmare, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volume 67, Issue 4, April 2012, Pages 810–818

OLIVEIRA, G. L. S. Capacidade antioxidante celular da rutina frente ao dano oxidativo induzido em linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2015;36(3):461-466

OZCAN, S. K., BUDAK, F., YUCESOY, G., SUSEVER, S., WILLKE, A. Prevalence, susceptibility profile and proteinase production of yeasts causing vulvovaginitis in Turkish women. APMIS. 2006;114(2):139-45.

PIANOVSKI, A. R. et.al. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliensis*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação de estabilidade física. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.44, n.2. p.249 – 259, 2008

PIGNATARI, A.C.C., MAMIZUCA, E.M. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada a assistência em saúde. Módulo 3: Principais síndromes infecciosas. Capítulo 3: Infecções da pele e tecido subcutâneo. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2013. p. 37-53.

RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. Biochem Soc Trans. 1996 Aug;24(3):790-5

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.

SANTOS JUNIOR, A F.; OLIVEIRA, L. C.; GUEDES, A. S.; MOTA, M. D.; MAGALHAES, H. I. F. Atividade antioxidante e tóxica de extratos de cascas do fruto de *Nephelium lappaceum* L. (Sapindaceae), comercializados em Salvador, Bahia, Brasil. Infarma Cienc. Farmac. .v28.e3.a 2016.pp173-178

SANTOS, J. C., OLIVEIRA, C. A. N., VARELLA, L., MATOS, A. P. CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE *Dilodendron bipinnatum* (SAPINDACEAE). Quim. Nova, Vol. 33, No. 10, 2080-2082, 2010

SANTOS, T. C.; JÚNIOR, J. E. N.; PRATA, A. P. N. Frutos da Caatinga de Sergipe utilizados na alimentação humana. Scientia Plena, v. 8, n. 4, p. 1-7, 2012.

SCHWAB, D.W., HERLING, A., HEMMERLE, H., SCHUBERT, G., HAGENBUCH, B., BURGER, H. Hepatic uptake of synthetic chlorogenic acid derivatives by the organic anion transport proteins. *J. of Pharmacology and Exp. Therap.*, v. 296, n.1, p. 91-98, 2001.

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.

SOARES, S. E.. Phenolic acids as antioxidants. *Rev. Nutr.* vol.15 no.1 Campinas Jan. 2002 (<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732002000100008>)

SOUZA, M. P. et al. Phenolic aroma compositions of pitomba fruit (*Talisia esculenta* Radlk) assessed by LC-MS/MS and HS-SPME/GC-MS. *Food Research International*, v. 83, p. 87- 94, 2016.

SOUZA, M. P., BATAGLION, G. A., SILVA, F. M. A., ALMEIDA, R. A., PAZ, W. H. P., NOBRE, T. A., MARINHO, J. V. N., SALVADOR, M. J., FIDELIS, C. H. V. Phenolic and aroma compositions of pitomba fruit (*Talisia esculenta* Radlk.) assessed by LC–MS/MS and HS-SPME/GC–MS. *Food Research International* 83 (2016) 87–94

SOUZA, V.B.; FERREIRA, J.R.N. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 2010;31(3):217-222

TAGURI, T.; TANAKA, T.; KOUNO, I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol. Pharm. Bull.* 27 (12), 1965-9. 2004

TEIXEIRA, M., CERQUEIRA, F., BARBOSA, C.M., NASCIMENTO, M.S.J., PINTO, M. Improvement of the inhibitory effect of xanthenes on NO production by encapsulation in PLGA nanocapsules. *Journal of Drug Targeting*, 13, 129–135. 2005.

URZUA, A. et al. Antimicrobial study of the resinous exudate and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v.46, p.31- 47, 1998 (doi:10.1016/S0378-8741(98)00068-3.)

VELASCO, M.V.R.; MACIEL, C.P.M.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; CONSIGLIERI, V.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Desenvolvimento e Teste Preliminar da Estabilidade de formulações cosméticas acrescidas de extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 29, n.2, p. 181-196, 2008

VENTURA, Claudio Angelo. Estudo da citotoxicidade em células animais induzida pela ação da lectina de sementes de *Talisia esculenta*. 2006. 62f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia,

Campinas,SP.Disponível

em:

<<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/314779>>

YASUNAKA, K.; ABE, F., NAGAYAMA, A., OKABE, H., LOZADA-PÉREZ, L., LÓPEZ-VILLAFRANCO, E., MUÑIZ, E.E., AGUILAR, A., REYES-CHILPA, R. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;97:293-299.

5.0 – CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que o extrato bruto das folhas de *Talisia esculenta* Radlk. apresentam compostos que já são relatados na literatura (ácidos fenólicos e flavonóides) e que possuem relação direta com as atividades biológicas testadas. A atividade antioxidante apresenta ação superior a de antioxidantes padrões e é diretamente proporcional à concentração do extrato.

O extrato e os bioprodutos derivados apresentaram importante atividade antimicrobiana frente cepas de bactérias e fungos (padrão e isolados clínicos) de importância clínica para o ser humano.

Com a investigação da atividade hemolítica comprovou-se que o extrato e bioprodutos não são irritativos às hemácias. E que o extrato bruto não é tóxico às células testadas. Sugerindo assim que o produto apresenta segurança toxicológica.

As formulações farmacêuticas (bioprodutos) mostraram-se potencialmente viáveis no desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de doenças infecciosas e apresentaram boa estabilidade físico-química e microbiológica que assegura a qualidade e eficácia dos mesmos.

REFERENCIAS

ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. *Talisia*. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: . Acesso em: 08 de Nov 2019.

ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P.; WURDACK, K.J.; FERRUCCI, M.S.; JOHNSON, G.; DIAS, P.; COELHO, R.G.; SOMNER, G.V.; STEINMANN, V.W.; ZIMMER, E.A.; STRONG, M.T. Generic relationships and classification of Tribe Paullinieae (Sapindaceae) with a new concept of Supertribe Paullinioidae. **Systematic Botany**, v.42, n.1, p.96-114, 2017.

ADÉKAMBI, T.; REYNAUD – GAUBERT, M.; GREUB, G.; GEVAUDAN, M. J.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Amoebal coculture of “*Mycobacterium massiliense*” sp. Nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. **J Clin Microbiol.** 2004;42(12):5493-501.

ALMEIDA, K. P. C. et al. Prospecção fitoquímica do extrato vegetal de *Piper mollicomum* Kunth (Piperaceae) e seu potencial antimicrobiano. **R. gest. sust. ambient.**, Florianópolis, v. 8, n. 3, p. 550-565, jul/set. 2019.

ALTERTHUM, F.; TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2003, 720p.

ALU'DATT, M.H et al. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. **Food Chemistry**, n. 218, p. 99-106, 2017.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p.517-524, 2006.

BAPTISTA, M. G. F. M. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. 2013. 42f. **Dissertação de Mestrado** - Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa.

BLAIR, J. M. et al. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Nature**, v. 13, p. 42- 51, 2015

BRASIL. Ministério do meio ambiente. **Biodiversidade**. 2018. Disponível em: 327 <http://www.mma.gov.br/biodiversidade>. Acessado em 08 de Novembro de 2019.

CATHERINOT, E., CLARISSOU, J., ETIENNE, G., RIPOLL, J. F.; DAFFÉ, M., PERRONNE, C. Hypervirulence of a rough variant of the Mycobacterium abscessus type strain. **Infect Immun**. 2007;75(2):1055-8.

COSTA, A. L. P. et al. Análise qualitativa fitoquímica e do potencial antimicrobiano do extrato bruto de casca de bertholletia excelsa Humb. & Bomp. (Lecygdaceae) frente a microrganismos gram-positivos. **Ciência Equatorial**, v.22, p. 26-34, 2012.

COSTA, A.L.P. Resistência Bacteriana aos Antibióticos: Uma Perspectiva Do Fenômeno Biológico, Suas Consequências e Estratégias De Contenção. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIFAP, Macapá, 2016.

COWAN, M. M et al. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v.12, n.4, 1999.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v.12, n.4, 1999.

FRAGA, L.N. Compostos bioativos, capacidade antioxidante e citotoxicidade da casca e polpa da pitomba [*Talisia esculenta* (St. Hil.) Radlk.]. 2018. 131f. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição)** - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2018.

FREIRE, M. G. M., FRANCO, O. L.; KUBO, C. E. G.; MIGLIOLO, L.; VARGAS, R. H.; OLIVEIRA, C. F. R.; PARRA, J. R. P.; MACEDO, M. L. R. (2012). "Structural insights regarding an insecticidal *Talisia esculenta* protein and its biotechnological potential for *Diatraea saccharalis* larval control". **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part B 161: 86–92.

GALLEGOS, P. F.; BAÑUELOS, R. V.; DELGADILLO, L. R., MEZA, C. L.; ECHAVARRÍA, F. C. Antibacterial activity of five terpenoid compounds: carvacrol, limonene, linalool, α -terpinene and thymol. **Tropical and Subtropical Agroecosystems** 22 (2019): 241-248

GAYATHRI, R.; LILY, T. K.; DEEPA, P.; MANGAL, S.; MADHAVAN, H. N; Antibiotic susceptibility pattern of rapidly growing mycobacteria. **J Post Med**. 2010;56(2):76-8.

GHANI, M.A. et al. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food Chemistry**, 2017.

GORNI, P. H. Atividade elicitora do ácido salicílico sobre o perfil de metabólitos primários e secundários com potencial antioxidante de *Achillea millefolium* L. cultivada a campo. 2018. 114f. **Tese (Doutorado em Agronomia)** - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2018.

LEÃO, S. C.; VIANA-NIERO, C.; MATSUMOTO, C. K.; LIMA, K. V. B; LOPES M. L. Epidemic of surgical – site infections by a single clone of rapidly growing mycobacteria in Brazil. **Future Microbiol**. 2010;5(6):971-80.

LEÃO, S.C.; TORTOLI, E.; VIANA-NIERO, C.; UEKI, S.; LIMA, K. V. B.; LOPES M. L. Characterization of Mycobacteria from a Major Brazilian Outbreak Suggest that Revision of the Taxonomic Status of Members of the *Mycobacterium chelonae* – *M. abscessus* Group is needed. **J Clin Microbiol**. 2009;47(9):2691-8.

LESER, W.; BARBOSA, V.; BARUZZI, R.G.; **Elementos de Epidemiologia Geral**, Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, 1985

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. v.1, 7.ed. São Paulo: **Instituto Plantarum**, 2016. 384p.

MACEDO, M. L. R., FREIRE, M. G. M., KUBO, C. E. G., PARRA, J. R. P. (2011). "Bioinsecticidal activity of *Talisia esculenta* reserve protein on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Anticarsia gemmatalis*." **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C 153 (2011) 24–33.

MEDJAHED, H.; GAILLARD, J.; REYRAT, J. Mycobacterium abscessus: a new player in the mycobacterial field. **Trends Microbiol.** 2010;18(3):117-23.

MEDJAHED, H; GAILLARD, J; REYRAT, J. Mycobacterium abscessus: a new player in the mycobacterial field. **Trends Microbiol.** 2010;18(3):117-23.

MUNIZ, J. J. et al. Resistência aos antibióticos utilizados para tratamento de infecções por *Klebsiella pneumoniae* em um hospital. **Revista de Ciências da Saúde Básica e Aplicada**, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 3-10, jul. 2019.

NERI-NUMA, I. A., CARVALHO-SILVA L. B., FERREIRA, J. E. M., MACHADO, A. R. T., MALTA, L. G., RUIZ, A. L. T. G., CARVALHO, J. E., & PASTORE, G. M. "Preliminary evaluation of antioxidant, antiproliferative and antimutagenic activities of pitomba (*Talisia esculenta*)". **Food Science and Technology**, 59, 1233- 1238. 2014

OLIVEIRA, C. M.; CRUZ, M. M. Sistemas de Vigilância em Saúde no Brasil: Avanços e Desafios. **Saúde Debate**, n. 104, v. 39, p. 255-267, 2015.

OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. **Plantas Tóxicas: conhecimento para a prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2003. v.1, 64 p.

QUEIROGA, A.X.M. Caracterização física, química e funcional dos frutos da pitombeira (*Talisia esculenta*). 2015. 27f. **Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais)** - Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2015.

ROMERO, C. D.; CHOPIN, S. F.; BUCK, G.; MARTINEZ, E.; GARCIA, M.; BIXBY, L. Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. **J Ethnopharmacol**, Texas, v.99, n.2, p.253-257, Jun, 2005.

SAKER., L. S. et al. Globalization and Infectious diseases: a review of the linkages. UNICEF/UNDP/WORLD BANK/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases. 2004

SENA, L.H.M. Conservação de sementes e produção de mudas de pitombeira (*Talisia esculenta* (A. St. Hil.) Radlk.). 2014. 122f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais)** - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed.Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2007.

SIQUEIRA, C. M. M. Resistência aos Antibióticos: O uso inadequado dos antibióticos na prática clínica. **Resista de la Organización de Farmacéuticos Iberoamericanos**, v. 14, n. 1, p. 45-68, 2004.

SOUZA, M.P.; BATAGLION, G.A.; SILVA, F.M.A.; ALMEIDA, R.A.; PAZ, W.H.P.; NOBRE, T.A.; MARINHO, J.V.N.; SALVADOR, M.J.; FIDELIS, C.H.V.; ACHO, L.D.R.; SOUZA, A.D.L.; NUNOMURA, R.C.S.; EBERLIN, M.N.; LIMA, E.S.; KOOLEN, H.H.F. Phenolic and aroma compositions of pitomba fruit (*Talisia esculenta* Radlk.) assessed by LCMS/MS and HS-SPME/GC-MS. **Food Research International**, v.83, p.87-94, 2016

TAVARES, W. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico**. São Paulo: Atheneu, 2006, 615p.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.3, p. 281-301, 2000.

VERPOORTE, R.; VANDER HEIJDEN, R.; MEMELINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Res.**, v.9, p.323-343, 2000.

VIRGOLIN, L.B. et al. Composition, content of bioactive compounds, and antioxidante activity of fruit pulps from the Brazilian Amazon biome. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.52, n.10, p.933-941, 2017.

VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J. F. G.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, M. D.; OLIVEIRA, A. B.; MIGUEL, O. G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.15, n.2, p.137-142, 2005.

WONGKITISOPHON, P.; RATTANAEMAKON, P.; TANRATTANAKORN, S.; VACHIRAMON, V. Cutaneous Mycobacterium abscessus infection associated with mesotherapy injection. **Case Reports in Dermatology**. 2011;3:37-41.