UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

LÁZARO GOMES DO NASCIMENTO

ESTUDO FICOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALGAS MARINHAS DO GÊNERO *SARGASSUM*

João Pessoa - PB
2014

ESTUDO FICOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALGAS MARINHAS DO GÊNERO *SARGASSUM*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia, da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para conclusão.

Orientadora: **Prof[a]. Dra. Celidarque da silva Dias**

João Pessoa - PB
2014

LÁZARO GOMES DO NASCIMENTO

ESTUDO FICOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALGAS MARINHAS DO GÊNERO *SARGASSUM*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia, da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para conclusão.

Monografia aprovada em ____ / ____ / ____

_____
Prof[a]. Dra. Celidarque da Silva Dias
Orientadora – UFPB

_____
Mestre-Ricardo Carneiro Montes
Examinador – UFPB

_____
Farmaceutico BioquImico-Ricardo Cartaxo Ramalho
Examinador – UFPB

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: Ana Terezinha Gomes do Nascimento e Antônio José Nascimento Por investirem e acreditarem em mim, por me guiarem para os melhores caminhos, sempre com muito amor, compreensão e dedicação. Foram vocês que me ensinaram os princípios e valores que tenho como essenciais em minha vida. A pessoa que sou hoje devo a vocês!

AGRADECIMENTOS

A **Deus,** pela VIDA abençoada com muita saúde e felicidades, e por todas as oportunidades que fez surgir no meu caminho. Agradeço por sempre ter me dado forças nos momentos que mais acreditei não ter saída...

Aos **meus pais**, que nunca mediram esforços para oferecer o melhor a mim. Se não fosse por eles, esta página não estaria sendo escrita agora.. Obrigada por tudo!

A **minha esposa** Rejane, meu porto-seguro, companheira de uma vida toda, a quem primeiro eu recorro em horas difíceis, sempre esteve ao meu lado, me incentivando e dando apoio.

Aos meu amigo, Ricardo carneiro e Ricardo Cartaxo, agradeço por me ajudarem no meu crescimento.

A orientadora **Prof^{a}. Dra. Celidarque da Silva Dias**, pela confiança, incenti e dedicação. Por ela tenho profunda admiração e respeito. Foi um orgulho fazer parte da sua equipe.

A equipe da **FITOQUÍMICA**, que me ajudaram dentro e fora do laboratório, mostrando que mais do que colegas de trabalho somos amigos de verdade, podem sempre contar comigo!

Aos **colegas de curso**, pelos bons momentos que passamos juntos, pelas risadas e momentos de descontração dentro e fora da Universidade. Sempre lembrarei com carinho de cada um.

“Se não existe esforço, não existe progresso”

Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo o que mais nos incentiva, que mais nos valoriza e também mais nos torna conscientes da nossa responsabilidade, é saber que os outros creem em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos.

(Albert Einstein)

RESUMO

Sargassum é um gênero de algas marinhas pardas da família Sargassaceae que é representada por cerca de 150 espécies. No estado da Paraíba, a flora marinha começou a ser estudada a partir das primeiras décadas deste século. A publicação da primeira lista de espécies efetuadas por Luetzelburg, entre 1922 e 1923, pode ser considerada o marco inicial das investigações ficológicas na Paraíba (Carvalho, 1983). As algas macroscópicas marinhas apesar de despertar a atenção da comunidade científica pela grande potencialidade como produtora de substâncias químicas e médico-farmacológico, no Brasil, em especial no Nordeste, são poucos os estudos efetuados com este propósito. Tendo em vista a disponibilidade e a diversidade da nossa biomassa, torna-se imperativo que estudos prospectivos sejam realizados, objetivando a identificação de substâncias oriundos de macroalgas marinhas com atividade farmacológica. Foi possível observar algumas atividades farmacológicas de algas descritas na literatura, entre as quais podemos citar atividade: anticoagulante, antioxidante, antipirético e analgésico. É importante demonstrar que o conhecimento sobre o perfil químico pode contribuir para os estudos taxonómico da familia Sargassaceae. O presente trabalho, desenvolvido no Laboratório de Farmacoquímica/Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (Centro de Ciências da Saúde), Universidade Federal da Paraíba, tem como propósito analisar a atividade antimicrobiana das fases e constituintes isolados da alga do gênero *Sargassum.*

Palavras-chave: *Sargassum*, feofitina, atividade antifúngica.

ABSTRACT

Sargassum is a genus of brown seaweed Sargassaceae family represented for 150 species. In the state of Paraíba, the marine flora began to be studied from the first decades of this century. The publication of the first list of species made by Luetzelburg between 1922 and 1923 can be considered the starting point of the investigations fhycologi in Paraíba (Carvalho, 1983). Navies macroscopic algae despite arouse the attention of the scientific community for their great potential as a producer chemicals for industrial, economic and medical- pharmacological interest in Brazil, especially in the Northeast, there are few studies conducted for this purpose, our group being a pioneer in research fhytocheistry. Given the availability and diversity of our biomass, it is imperative that prospective studies be carried out to identify potential compounds derived from marine macroalgae with pharmacological activity. Next we observe some pharmacological activities of algae described in the literature, among which we can mention: alginates, florotaninos, coumarins, chromones, quinones, and terpenoids feoftinas. Studies have shown that metabolites produced by algae of the genus Sargassumtiveram biological activities, such as anticoagulant, antioxidant, analgesic and antipyretic. It is important to demonstrate that knowledge about the chemical profile may contribute to the taxonomic studies of family Sargassaceae. This work, developed at the Laboratory of Pharmacology/ Graduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products and Mycology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences (Health Sciences Center), Federal University of Paraíba, intended to analyze the microbial activity antimicrobial constituents of the phases and seaweed of the genus Sargassum .

Keywords : Sargassum, pheophytin, antifungal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (a) Desenho esquemático de uma planta *Sargassum* com três ramos laterais; (b) aspecto dos receptáculos masculinos; (c) Aspectos do receptáculos femininos; (d) vesículas; (e) aspecto do corte transversal na região do criptostoma (Coimbra,2006).....18

Figura 2 Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *Sv-1*.....34

Figura 3 Estrutura química da substância S13^2-hidroxi-(13^2-*S*)-feofitina *a* 37

Figura 4 Estrutura química da substância 13^2-hidroxi-(13^2-*R*)-feofitina 37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento Sp^1 após analise dos espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) em $CDCl_3$.....19

LISTA DE ESQUEMA

Esquem 1 Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto de *Sargassum vulgare* var*. nanum*.....27

Esquema 2 Fracionamento da fase etérea do extrato etanólico bruto de *Sargassum vulgare* var.*nanum.*.....29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Eluentes utilizadas e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase etérea do extrato bruto de *Sargassum vulgare* var*. nanum*.....30

Tabela 2 Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento Sp^1, após analise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) em $CDCl_3$.....35

Tabela 3 Concentração inibitória mínima (µg/mL) da mistura (R,S,13-hidroxifeofitina) sobre espécies de *Candida*- técnica de microdiluição.....38

Tabela 4 Concentração inibitória mínima (µg/mL) da mistura (R,S,13-hidroxifeofitina) sobre espécies de *bactérias*- técnica de microdiluição.....39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt: acetato de etila
Rf: Fator de retenção
APT: Attached Proton Test
CIM: Concentração inibitória mínima
C_2H_6O: Etanol
CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
$CDCl_3$: Clorofórmio deuterado
$CHCl_3$: Clorofórmio
CH_3OH: Metanol
IV: Infravermelho
J: Constante de acoplamento
KBr: Brometo de Potássio
kg: Quilograma
L: Litro
mg: Miligrama
MHz: Megahertz
Na_2SO_4: Sulfato de Sódio
P.N.: Produtos naturais
RMN ^1H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ^{13}C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
UV: Ultravioleta
δ: Deslocamento Químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 17

2.1. Metabólitos secundários estudados no gênero sargassum 19

2.2. Considerações sobre a espécie Sargassum vulgare var. nanum E. de Paula ... 21

3.OBJETIVOS 23

3.1. Geral 23

3.2. Específico 23

4. MATERIAIS E MÉTODOS 25

4.1. Levantamento bibliográfico e coleta do material vegetal 25

4.2. Processamento do material vegetal 25

4.3. Preparação do extrato etanólico de *Sargassum vulgare* var*. nanum* 25

4.4. Particionamento do extrato etanólico bruto com solventes orgânicos 26

4.5 Fracionamento cromatográfico da fase etérea 28

4.6. Atividade antimicrobiana da mistura racêmica 13-hidroxi-feofitina a isolada de *Sargassum vulgare var. nanum* 31

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 34

5.1. Identificação estrutural de *Sv-1* 34

5.2. Atividade antimicrobiana da mistura isolada de *Sargassum vulgare* var. *nanum* 38

6. CONCLUSÕES 41

7. PERSPECTIVAS 43

8. REFERÊNCIAS 45

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As plantas produzem metabólitos primários e secundários que abrangem uma ampla gama de funções (CROTEAU, KUTCHAN; LEWIS, 2000). Metabólitos primários, que incluem aminoácidos, açúcares simples, ácidos nucléicos e lipídios, são necessários para os processos celulares vitais. Metabólitos secundários incluem compostos produzidos em resposta a um estresse, funcionando como arma biológica para a defesa contra parasitas ou predadores (KEELING& BOHLMANN, 2006). Pode-se dizer que o estudo dos metabólitos primários é uma pesquisa realizada a partir de conhecimentos em química orgânica, farmacoquímica, farmacologia e relação-estrutura-atividade (SAR) aplicadas a produtos naturais de origem vegetal, animal ou microbiana. Desde séculos atrás, a medicina tradicional e os produtos naturais caminham lado a lado na cura de doenças por medicamentos ou na descoberta de venenos naturais. Na atualidade, os produtos naturais ainda fornecem produtos para novas drogas candidatos ao tratamento em terapias clínicas.

Na primeira revolução industrial, os pesquisadores buscavam novas drogas, mas com intuitos diferentes dos anteriores. Os metabólitos secundários passaram a ter maior importância como possivelmente fármacos após o descobrimento dos salicilatos obtidos da *Salix alba*. A busca para novos medicamentos agora não é mais ao acaso, a tecnologia se intensifica para colocar no mercado novos lançamentos a partir de produtos naturais que passam por um processo de semi-síntese ou síntese total. Com isso, surgiu o barbital (ácido 5,5-dietilbarbitúrico), em 1903, indicado como agente hipnótico; a epinefrina em 1904 e em seguida a procaína e a benzocaína, todos esses agentes são da classe dos ésteres do ácido *para*-aminobenzóicos e foram sintetizados, baseando-se na estrutura da cocaína (VIEGAS& BOLZANI, 2006).

Embora o planejamento de fármacos passa a consolidar a indústria farmacêutica, outros modos de planejamento viriam a ser abordados. Com o tempo, o planejamento racional de fármacos baseado no metabolismo passou ser um requisito implementar nas linhas de pesquisas farmacêuticas. A oxamniquina é um

fármaco esquistossomicida originado da hicantona, desenvolvida em pesquisa de metabolismo de um precursor chamado lucatona (VIEGAS& BOLZANI, 2006). A síntese de fármacos marcou o início de uma nova etapa nos programas de pesquisas de novas drogas, porém à medida que o tempo passava, a síntese química ficou dispendiosa demais, uma vez que muitos protótipos não ultrapassam as etapas pré-clinicas e clínicas. Neste momento, a indústria farmacêutica voltou seus olhos para uma pesquisa que possa aliar tempo, dinheiro e começa a investir pesadamente na química combinatória.

Havia um pensamento de que a química combinatória acoplada ao conhecimento da estrutura básica iminente do genoma humano traria um avanço muito rápido nas pesquisas. Acreditava-se que as informações mais relevantes seriam entregues em tempo mais rápido e em maior número para todas as áreas terapêuticas em relação aos métodos tradicionais de descoberta de drogas. Entretanto, em meados da década de 90, os resultados da busca em bibliotecas de química combinatória não chegaram a ser tão promissora quanto se dizia (BUTLER, 2004). A razão para que esses resultados fossem insatisfatórios estava na diferença da estrutura química entre um composto sintético e um produto natural. Compostos de origem natural ocupam um tipo de espaço que se conectam com naturalidade a outras moléculas de um organismo, algo que influenciou muito na síntese de novas substâncias. As bibliotecas começaram a utilizar modelos de produtos naturais para novas combinações sintéticas. Desta maneira, alguns grupos de pesquisa e algumas industrias farmacêuticas começaram a sintetizar estruturas mais complexas para se adequar ao espaço ocupado por metabólitos naturais.

Nos últimos anos registraram o aparecimento de microrganismos cada vez mais resistentes ao antimicrobianos existentes. Este fato denota a necessidade constante de pesquisa de novas substância biologicamente ativas (Raffa *et al*.,2005). Algas são fontes de substâncias antibacteriana e antifúgicas. Os primeiros relatos de atividade antibiótica de compostos proveniente de algas datam da segunda década do século XX (Khaleafa *et al*., 1975).

Del vale e colaboradores (2001) e Hélio e colaboradores (2000) realizaram estudos sobre a atividade antimicrobiana de uma grande variedades de macroalgas pertencentes aos três grandes grupos (algas verdes, pardas e vermelhas). Estes autores demostraram que a capacidade de síntese de compostos antimicrobianos não se restringe apenas a um grupo de algas.

A literatura relata a existência de compostos anti-microbianos de estruturas variadas como policetídeos, florotaninos, terpenos halogenados, aglutininas, etc., encontrados não somente em macroalgas, mas também em microalgas eucarióticas e cianobactérias (Findlay e Patil, 1984; Bennamara *et al*.,1999; konig., 1999; Nagayama *et al*., 2002; khleafa *et al*., 1975). Vairappan e colaboradores (2004) demostraram a atividade antibacteriana de oito compostos halogenados isolados de cinco espécie de algas vermelhas *Laurência*. Estes compostos apresentam amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas inclusive cepas resistentes aos antibióticos vigentes mais utilizados tais como penicilina e vancomicina.

A maioria dos estudos foi realizada a partir de extratos orgânicos tais como metanólico, acetônico, etéreo, clorofómicos (Cordeiro *et al*., 2006), porém pesquisadores brasileiros demostraram a atividade antifúgica de extratos proteicos de algas vermelhas. Mello e colaboradores (1997) e Cordeiro e colaboradores (2006) avaliaram as propriedades antifúgicas de proteínas (aglutininas) de algas vermelhas *Hypnea musciformis* revelando resultados promissores.

Fundamentação teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

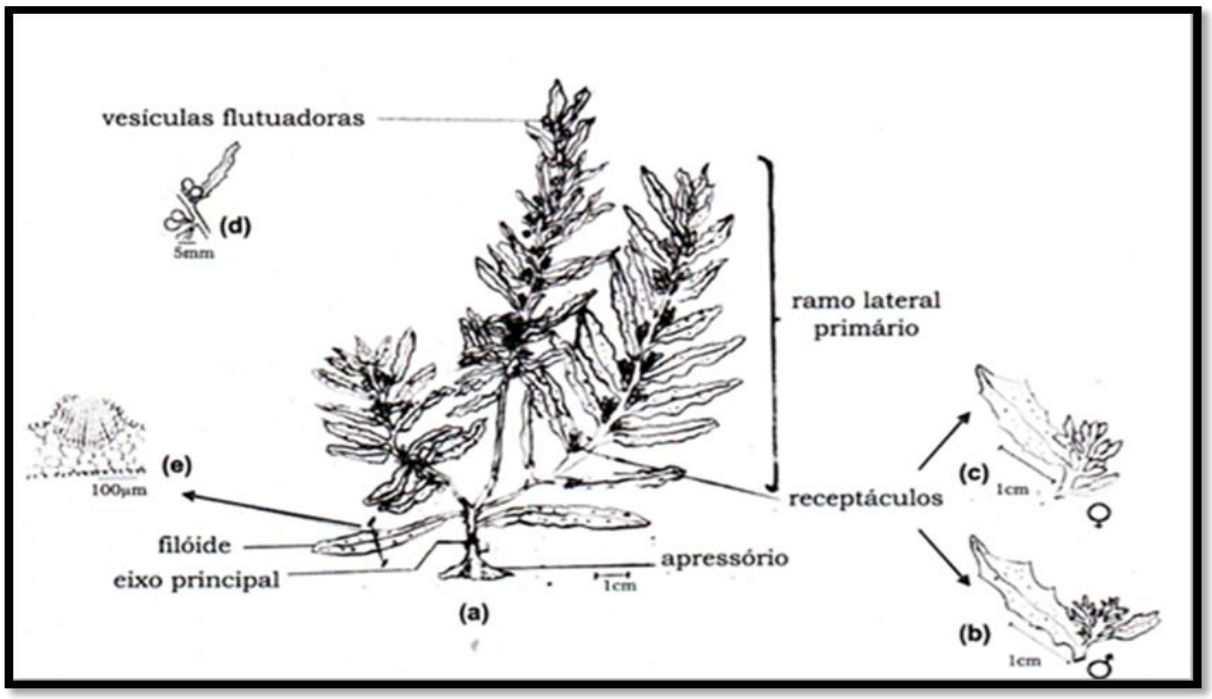
Quanto a família de algas pardas Sargassaceae é constituída de 29 gêneros nos quais estão distribuídas cerca de 481 espécies. Visto que essa família compreende os gêneros *Acystis, Anthophycus, Carpacanthus, Carpophyllum, Cladophyllum, Halochloa, Hizikia, Nizamuddinia, Pterocaulon, Sargassopsis, Sargassum* e*Turbinaria* (Algaebase, 2013). Os gêneros *Sargassum* e *Turbinaria* são as algas da família de maior distribuição, sendo a primeira encontrada em regiões tropicais e subtropicais em quase todos os oceanos e a segunda em regiões tropicais e subtropicais dos Oceanos Pacífico e Índico (Coimbra, 2006; Rohfritsch, Payri, Stiger, e Bonhomme, 2010). Na indústria alimentícia, algas como *Hizikia fusiformis* são consumidas na alimentação ou usadas como ingrediente herbal em países asiáticos da China, Coréia e Japão e também apresenta a propriedade de inibir a toxicidade causada pelo uso de acetomifeno (Hwang, Kim e Nam, 2008).

Os gêneros *Sargassum* e *Turbinaria* são as fontes mais ricas de alginatos, como também são conhecidas na comunidade científica por suas atividades biológicas. A produção de defesas químicas dessas algas aumenta consideravelmente em espécies de ecossistemas coralíferos onde a biodiversidade, a predação herbívora e a competição são mais elevadas (Zubia, Payri e Deslandes, 2008). Certamente, Grande parte dos trabalhos descritos na literatura relata que os extratos de várias espécies dessa família geralmente apresentam atividade biológica de importante relevância para estudo farmacológico, uma vez queatividade antioxidante já foi comprovada em extratos do gêneros *Hizikia, Sargassum* e *Turbinaria* (Choi, Hwang, Kim e Nam, 2009; Zubia, Payri e Deslandes, 2008), como tambématividades antimicrobiana, antitumoral,imuno-estimulatória, gastroprotetora em espécies dos gêneros *Carpophyllum* e *Hizikia* (Glombitza e Schmidt, 1999; Choi, Hwang, Kim, e Nam, 2009), o que demonstra serem detentores de uma biossíntese rica de compostos fenólicos.

Quanto ao gênero *Sargassum* constituído de macroalgas da família Sargassaceae que apresenta aspecto flutuante, onde forma um dos mais representativos dentre os 41 gêneros da ordem Fucales (Phaeophyceae, Heterokntophyta) sendo representado por 150 espécies. Sabe-se ainda que o gênero *Sargassum* se divide em 3 subgêneros: *Phyllotrichia*, *Sargassum* e

Bactrophycus (Stiger et al, 2003). As plantas do gênero *Sargassum* são compostas de apressório, eixos principais e ramos laterais, os quais se diferenciam a partir de eixos principais e constituem a maior parte do talo. Os ramos finais são laminares e assemelham-se às folhas das angiospermas, possuindo uma nervura central, sendo denominados filóides. Algumas espécies apresentam vesículas flutuadoras designadas de aerocistos e cavidades com poros, contendo ou não um ramo de pelos (ver **figura 1** abaixo) (Coimbra, 2006).

Figura1. (a) Desenho esquemático de uma planta *Sargassum* com três ramos laterais; (b) aspecto dos receptáculos masculinos; (c) aspectos do receptáculos femininos; (d) vesículas; (e) aspecto do corte transversal na região do criptostoma (Coimbra, 2006).



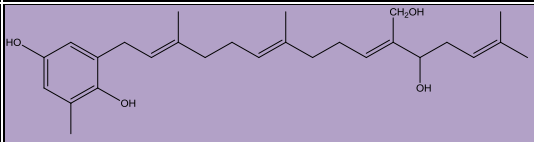
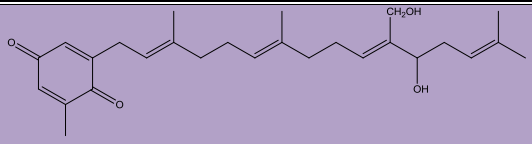
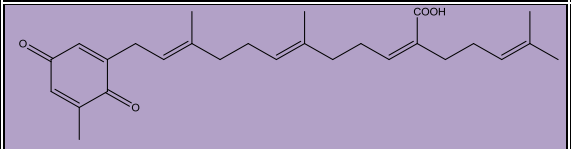
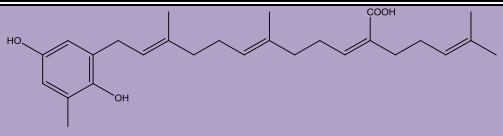
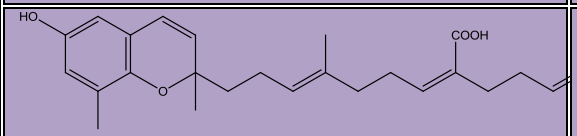
Economicamente, são utilizadas as partes secas e pulverizadas das plantas do gênero *Sargassum* para preparar massas de biscoitos, sorvetes e outros produtos alimentíceos (Wang, 2008). Além de serem utilizadas na indústria dos alimentos, ecologicamente, tem um papel importante para diminuição da poluição produzida pelo descarte humano, pois espécies de algas de *Sargassum* atuam como

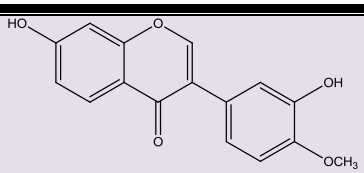
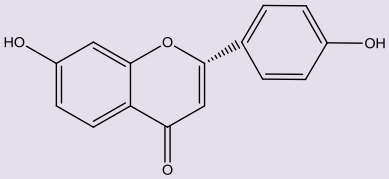
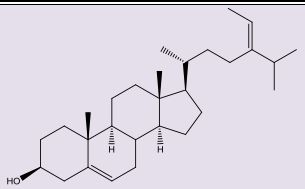
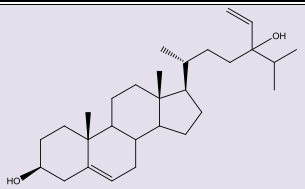
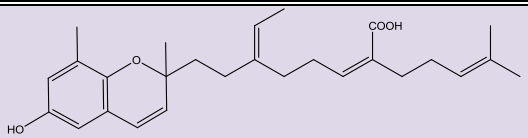
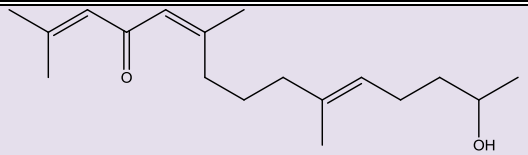
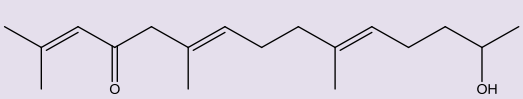
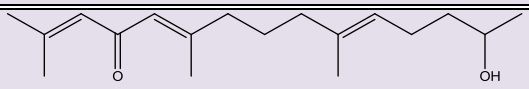
biofiltros marinhos, acumulando metais pesados tóxicos e, assim, diminuindo o impacto prejudicial ao ecossistema local das regiões costeiras litorêneas (Murugadas, Phang, e Tong, 1995).

2.1. Metabólitos secundários estudados no gênero sargassum

Dentre os metabólitos secundários, são encontrados no gênero *Sargassum* classes como cumarinas, cromonas do tipo meroterpenóides, quinonas, ácidos quinônicos e terpenóides.

Quadro 1. Produtos naturais isolados em espécies do gênero Sargassum.

Espécie	Composto	Classe do composto	Referências
S. fallax	 Fallahyhidroquinona	Quinona	Reddy, e Urban, 2009
	 Fallaquinona	Quinona	Reddy, e Urban, 2009
	 Ácido sargaquinoico	Quinona	Reddy, e Urban, 2009
	 Ácido sargahidroquinoico	Quinona	Reddy, e Urban, 2009
	 Sargacromanol	Cromona	Reddy, e Urban, 2009

S. pallidum	 Calicosina	Flavonoide	Liu et al., 2009
	 Liquiritigenina	Flavonoide	Liu et al., 2009
	 Fucosterol	Esteroide	Liu et al., 2009
	 Saringosterol	Esteroide	Liu et al., 2009
S. siliquastrum	 Mojabancromanol	Cromona	Cho et al., 2008
S. hemiphyllum	 Hedaol A	Bisnorditer peno	Takada et al., 2001
	 Hedaol B	Bisnorditer peno	Takada et al., 2001
	 Hedaol C	Bisnorditer peno	Takada et al., 2001

2.2. Considerações sobre a espécie *Sargassum vulgare* var. *nanum* E. de Paula

De acordo com levantamento de dados realizados no Chemical Abstracts, Biological Abstracts, NAPRALERT (banco de dados de artigos científicos publicados em revistas científicas do ponto de vista químico e biológico) constatou-se que a espécie *Sargassum vulgare* var. *nanum* E. de Paula não apresenta trabalhos científicos publicados na literatura.

Objetivo

3.OBJETIVOS

3.1. Geral

O presente trabalho tem como objetivo contribuir com o estudo farmacoquímico e avaliar a atividade antimicrobiana das fases obtidas da *Sargassu vulgare* var. *nanum*, bem como dos compostos químicos isolados.

3.2. Específico

Realizar extração, purificação e isolamentos dos constituintes químicos.

Analisar a forma estrutural dos constituintes químicos isolados a partir de técnicas espectroscópicas com RNM H^1 e C^{13}.

Avaliar atividade antimicrobina do extrato e das fases: heânica, diclorometânica, acetato e aquosa, como também da feofitina isolado da alga *Sargassum vulgare var. nanum.*

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Levantamento bibliográfico e coleta do material vegetal

Antes de realizar-se a coleta do material botânico utilizado na pesquisa da alga parda *Sargassum var. nanum*, foram feitos levantamentos bibliográficos realizados no Chemical abstract, Biological abstracts, NAPRALERT, dicionário de Produtos Naturais, periódicos CAPES e publicações relacionadas, no intuito de determinar suas principais características, tais como: classificação taxonômica do gênero *Sargassum,* descrição anatômica, perfil químico e farmacológico. A coleta de *Sargassum vulgare* var, *nanum* foi realizada na praia de Coqueirinho localizado no município do Conde-PB, e foi realizada através de arranque manual.

Após coletada, a alga foi lavada para eliminar prováveis “contaminantes” epífitas e fauna associadas, e posteriormente foi triturada. Esta triagem foi realizada nas dependências do Laboratório de Ficologia marinha do NEPREMAR (CCEN) e de fitoquímica do PgPNSB do CCS/UFPB.

A identificação da alga foi realizada pelo professor Dr. George Emmanuel Cavalcanti de Miranda (DBM/UFPB), efetuada com base em bibliografia especializada e técnicas correntes para identificação. Para a espécie coletada, foram preparadas 3 exsicatas que foram depositadas na seção de criptogramas do herbário Lauro Pires Xavier (JPB – DSE/UFPB).

4.2. Processamento do material vegetal

Foram coletadas 10,0 kg de algas frescas, em seguida foram colocadas em nitrogênio liquido que a fragmentou em pequenos pedaços e em seguida foi submetida a extração prontamente.

4.3. Preparação do extrato etanólico de *Sargassum vulgare* var*. nanum*

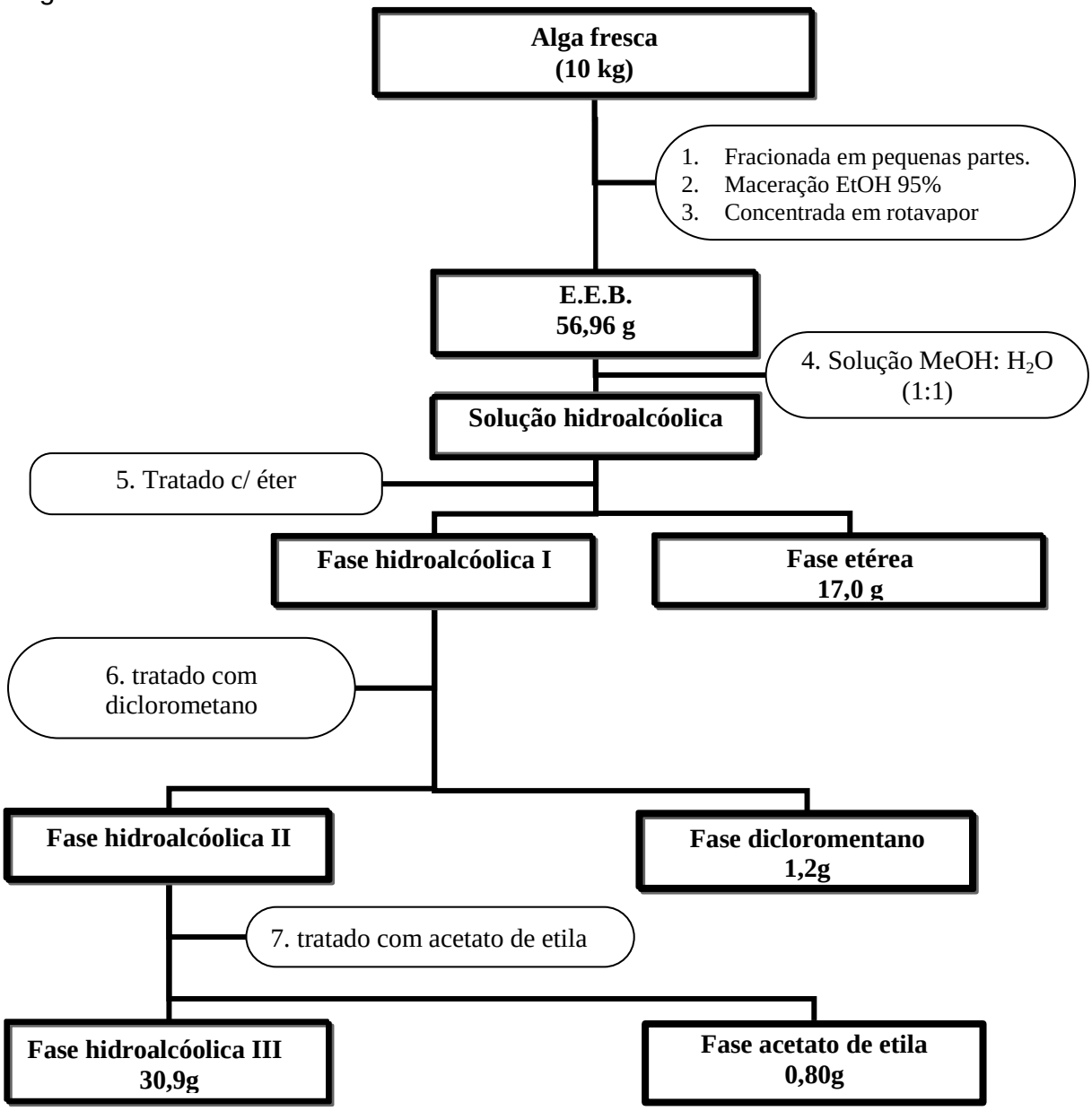
Para a preparação do extrato foi submetido a um processo de maceração, utilizando em cada processo de extração 5 L de EtOH (C_2H_6O) a 95°G.L, retirando-se a solução extrativa após um período de 72 horas. Essa solução foi filtrada e

concentrada em rotaevaporador rotatório a uma temperatura menor do que 50°C, sob pressão reduzida, rendendo 125 g do E.E.B.

4.4. Particionamento do extrato etanólico bruto com solventes orgânicos

O E.E.B. (59,96 g) foi concentrado e solubilizado em uma solução MeOH:H_2O (1:1 v/v) com auxílio de um agitador mecânico e depois filtrado. A solução foi colocada em uma ampola de separação onde foi particionada utilizando como solventes: éter etilico, diclorometano (CH_2Cl_2) e acetato de etila (AcOEt). As soluções fracionadas foram tratadas com Na_2SO_4 anidro, filtradas e concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida a 40°C, e seus rendimentos foram de 17,0 g da fase etérea, 1,2 g da fase diclorometânica e 0,80 g da fase AcOEt e 30,90 g da fase hidroalcoólica III, como pode ser visto no**. Esquema 1.** abaixo.

Esquema 1. Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto de Sargassum vulgare var. nanum.



4.5 Fracionamento cromatográfico da fase etérea

A fase etérea da alga (17,0 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (Art. 7734 MERCK) e os eluentes: hexano, diclorometano e metanol individualmente ou em sistemas binários em gradientse crescentes de polaridade. No total, foram coletadas de 180 frações de 250 mL que foram concentradas em rotaevaporador rotatório.

Todas as frações foram submetidas a cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), sendo analisadas e reunidas as frações que possuíam Rf semelhantes **(Esquema 2**, **tabela 2)**.

A fração 73-95 foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), no sistema de solvente AcOEt: hexano (4:6) no qual obteve-se uma fração que foi codificada como *Sv-1.* Esta fração foi levada para análise espectral de ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C, que foi identificada como uma mistura de duas substancia a partir da fase etérea, obtendo-se uma mistura de feofitinas (13^{2}-hidroxi-(13^{2}-*S*)-feofitina A e 13^{2}-hidroxi-(13^{2}-*R*)-feofitina A

Esquema 2. Fracionamento da fase etérea do extrato etanólico bruto de *Sargassum vulgare* var*. nanum.*

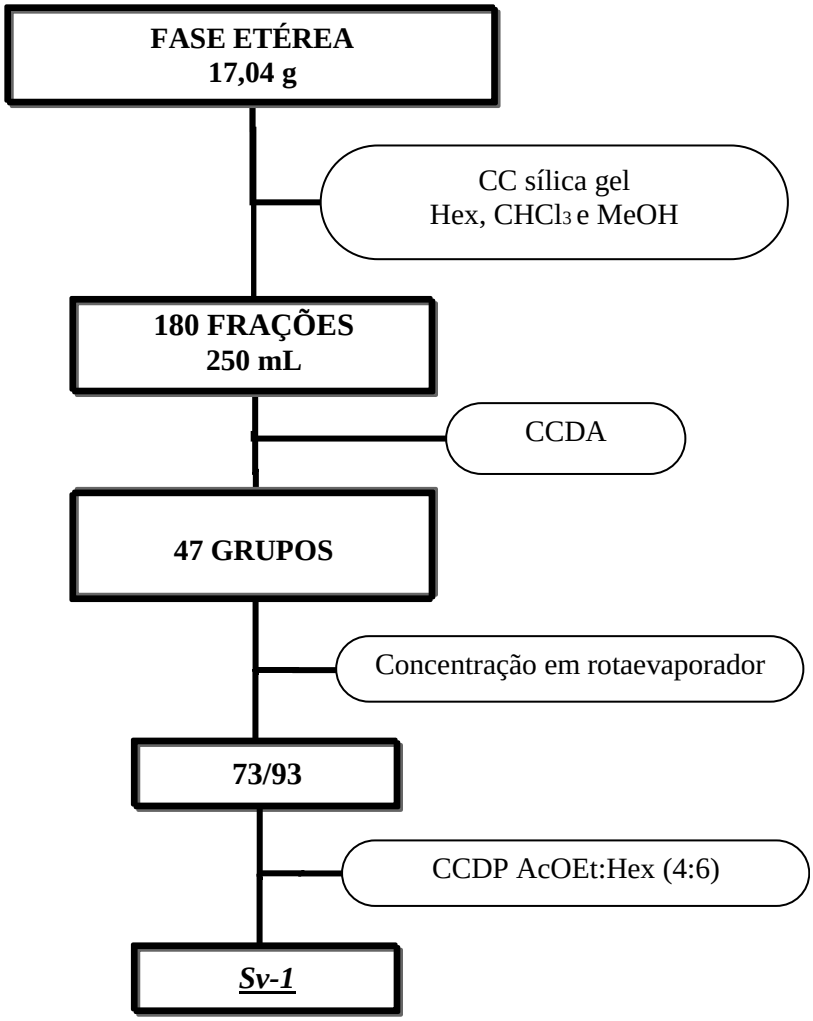


Tabela 1 Eluentes utilizadas e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase etérea do extrato bruto de *Sargassum vulgare* var*. nanum.*

Eluentes	Proporção	Frações eluídas	Frações reunidas
Hexano	100	1-5	2-3 4-6
Diclorometano:Hexano	1:99 – 6:94	6-26	14-15 16-19 22-26
Diclorometano:Hexano	7:93 – 19:81	27-39	27-32 33-39
Diclorometano:Hexano	20:80 – 44:56	40-68	41-58 59-68
Diclorometano:Hexano	45:55 – 63:33	69-80	69-73 **75-93** 76-80
Diclorometano:Hexano	64:32 – 80:20	81-98	81-93 94-95 96-98
Diclorometano:Hexano	81:19 – 86:14	99-105	100-103 104-105
Diclorometano:Hexano	87:13 – 100:0	106-118	106-112 113-118
Metanol:Hexano	0.5:99.5 – 2:98	119-121	**119-121**
Metanol:Hexano	4:96 – 9.5:90.5	122-131.3	123-131.2
Metanol:Hexano	10:90 – 30:70	132-180	**135.1** 135.3-136.1 139-164

4.6. Atividade antimicrobiana da mistura racêmica 13-hidroxi-feofitina a isolada de *Sargassum vulgare var. nanum*

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados pelo método de diluição seriada em meio liquido, técnica de microdiluição (ELOFF, 1987; CLEELAND; SQUIRES, 1991; BAWER et al, 1996; HADACECK; GREEGER, 2000; NCCLS, 2000).

A determinação da CIM dos produtos foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando-se microplacas contendo 96 poços com fundo chato e tampa (DISPO-PETRI/INLAB- Alamar Tecno Científica Ltda./SP). Inicialmente, adicionou-se aos poços, 100 µL de caldo nutriente (para bactérias) e caldo Sabouraud (para leveduras) duplamente concentrado. Em seguida, foi inoculado 100µL de cada produto solubilizado e foram feitas as diluições seriadas à razão de doi,nas concentrações de 1024 a 32 µg/mL. Então, na primeira fila de cavidades, as fases e a feofitina se encontrava na maior concentração e na menor concentração na sétima fileira. Posteriormente, 10 µL da suspensão dos microrganismos foram inoculados em todas as cavidades da placa.

Em paralelo, foram feitos controle do crescimento das espécies bacterianas e de leveduras, como também com os antimicrobianos padrão: cloranfenicol (50 µg/mL) para bactérias e nistatina (100UI/mL) para leveduras. O sistema foi incubado a 35°C/24-48 horas (VILJOEN et al., 2003; SAHIN et al., 2004). Após o tempo de incubação adequado, foi feita a primeira leitura dos resultados para determinação da CIM do óleo essencial frente os dois grupos de microrganismos ensaiados. A determinação da CIM do óleo essencial sobre os microrganismos foi determinada através de observação visual, tomando como base o fato de que o crescimento nos poços da placa de microdiluição ocorreu através da formação dos chamados botões de crescimento- aglomerado de células (ESPINEL INGROFF et al., 1991; ESPINEL INGROF et al., 1992; HADACECK; GREEGER, 2000; NCCLS, 2000).

Em seguida, foi utilizado o seguinte procedimento: adicionou-se 20µL de solução do corante resauzurina a 0,01 % (INLAB), o qual é reconhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução (MANN; MARKAN, 1998; SALVAT et al., 2001; BURT, REINDERS, 2003). Assim, quando ocorreu mudança de coloração do corante (azul para vermelho), considerou-se como indicador de crescimento microbiano; e se a cor permanece azul, significa a ausência de crescimento microbiano. E foi considerada como CIM, a menor concentração das fases capaz de

inibir o crescimento da cepa ensaiada, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador.

A atividade biológica do produto será interpretada e considerada ativa ou não, conforme os seguintes critérios: 50-100 µg/mL=excelente/ótima atividade; 100-500µg/mL=moderada atividade; 500-1000 µg/mL=baixa atividade; > 1000 µg/mL=produto inativo (HOLETZ et al.; 2002; HOUGHTON et al.; 20007).

Resultado e discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Identificação estrutural de *Sv-1*

As substancias codificadas como *Sv-1* foi obtida na forma de um sólido verde-escuro amorfo com ponto de fusão entre 169-171,0 °C e com rendimento de 20 mg, ou seja, 0,003% em relação ao extrato.

O espectro de IV (**Figura 2** , abaixo) deste composto mostrou uma banda de absorção em 3433 cm^{-1} típico de deformação axial de N-H ou O-H, sugerindo a presença de aminas e/ou hidroxilas. No entanto, a presença de absorção em 1379 cm-1 atribuído ao estiramento da ligação C-N possibilitou afirmar sobre a suspeita de aminas. Absorções em 1716 e 1055 cm^{-1}, referente a estiramento de C=O e C-O, respectivamente, sugerem a presença de carbonila de éster. (SILVERSTEIN & WEBSTER,2007; PAVIA et al., 2001).

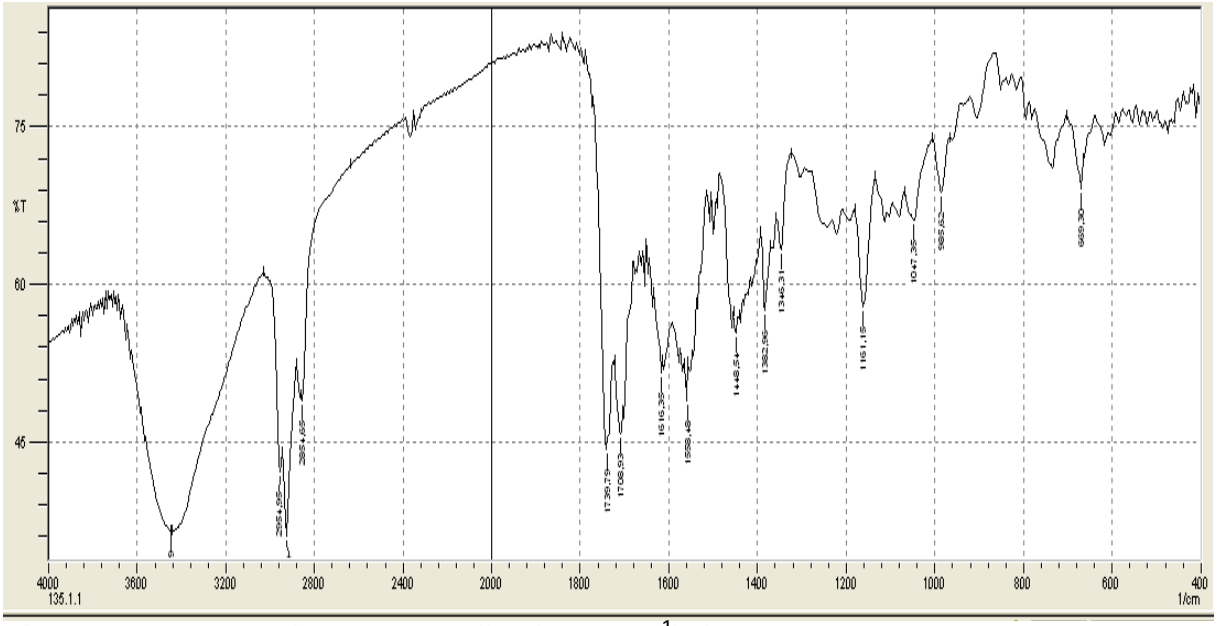


Figura 2. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *Sv-1*.

Os dados espectrais das substâncias obtidas de *Sargassum vulgare* var. nanum, foram sumarizados na **Tabela 2** a seguir. As substâncias isoladas podem ser visualizadas nas **Figuras 3 e 4** , página 37.

Tabela 2. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento Sp[1], após analise dos espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) em $CDCl_3$.

C	13₂-hidroxi-(13₂-*S*)-feofitina *a*		13₂-hidroxi-(13₂-*R*)-feofitina *a*	
	δC	δH	δC	δH
1	141,9	-	142,0	-
2	131,5	-	131,7	-
2¹	12,0	3,40 (*s*, 3H)	12,0	3,41 (*s*, 3H)
3	126,8	-	126,1	-
3¹	128,8	8,00 (*dd*, *J* = 11,2 e 18,0 Hz, 1H)	128,8	7,99 (*dd*, *J* = 11,2 e 18,0 Hz, 1H)
3²	122,6	6,28 (*d*, *J* = 18,0 Hz, 1H) 6,17 (*d*, *J* = 11,2 Hz, 1H)	122,6	6,28 (*d*, *J* = 18,0 Hz, 1H) 6,17 (*d*, *J* = 11,2 Hz, 1H)
4	136,2	-	136,2	-
5	97,6	9,45 (*s*, 1H)	97,6	9,42 (*s*, 1H)
6	155,1	-	155,3	-
7	135,9	-	135,9	-
7¹	10,9	3,23 (*s*, 3H)	10,9	3,24 (*s*, 3H)
8	144,8	-	144,8	-
8¹	22,6	3,67 (*m*, 2H)	22,6	3,67 (*m*, 2H)
8²	16,3	1,68 (*t*, *J* = 7,8 Hz, 3H)	16,2	1,68 (*t*, *J* = 7,8 Hz, 3H)
9	150,8	-	150,7	-
10	103,1	9,59 (*s*, 1H)	103,1	9,57 (*s*, 1H)
11	137,6	-	137,5	-
12	129,1	-	129,9	-
12¹	12,2	3,72 (*s*, 3H)	12,2	3,70 (*s*, 3H)
13	53,4	-	53,8	-
13¹	192,1	-	192,1	-
13²	88,9	-	89,1	
13³	173,6	-	173,5	
134	53,4	3,59 (*s*, 3H)	53,8	3,61 (*s*, 3H)
14	150,2	-	149,7	-
15	107,6	-	107,5	-
16	162,4	-	161,8	-
17	51,7	4,14 (*dl*, *J* = 7,0 Hz, 1H)	51,7	4,66 (*dl*, *J* = 6,8 Hz, 1H)
17¹	31,6	-	31,6	-
17²	31,1	-	31,1	-
17³	172,8	-	173,1	-
18	50,3	4,47 (*m*, 1H)	50,1	4,47 (*m*, 1H)
18¹	22,7	1,57 (*d*, *J* = 7,4 Hz, 3H)	22,7	1,57 (*d*, *J* = 7,4 Hz, 3H)
19	172,4	-	172,7	-
20	93,5	8,62 (*s*, 1H)	93,3	8,59 (*s*, 1H)
P¹	61,5	4,45 (*d*, *J* = 7,0 Hz, 2H)	61,3	4,53 (*d*, *J* = 6,8 Hz, 2H)
P²	117,8	5,15 (*t*, *J* = 7,2 Hz, 1H)	117,6	5,18 (*t*, *J* = 7,0 Hz, 1H)

P³	142,7	-	142,8	-
P3¹	17,3	-	17,3	-
P4	39,8	-	39,8	-
P5	24,9	-	24,9	-
P6	36,6	-	36,6	-
P7	32,7	-	32,7	-
P71	19,7	-	19,7	-
P8	37,3	-	37,3	-
P9	24,3	-	24,3	-
P10	37,3	-	37,3	-
P11	32,5	-	32,5	-
P111	19,7	-	19,7	-
P12	37,2	-	37,2	-
P13	24,7	-	24,7	-
P14	39,3	-	39,3	-
P15	27,9	-	27,9	-
P151	22,7	-	22,7	-
P16	22,3	-	22,3	-
132-OH	-	5,55 (*sl*, 1H)	-	5,34 (*sl*, 1H)

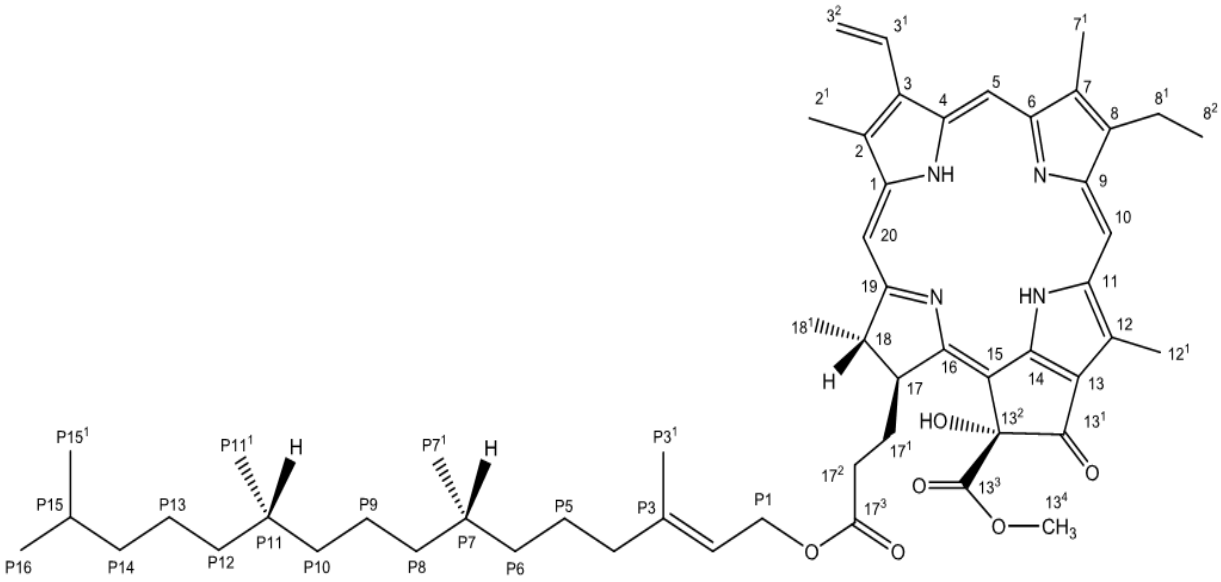


Figura 3. Estrutura química da substância S13^2-hidroxi-(13^2-*S*)-feofitina *a*

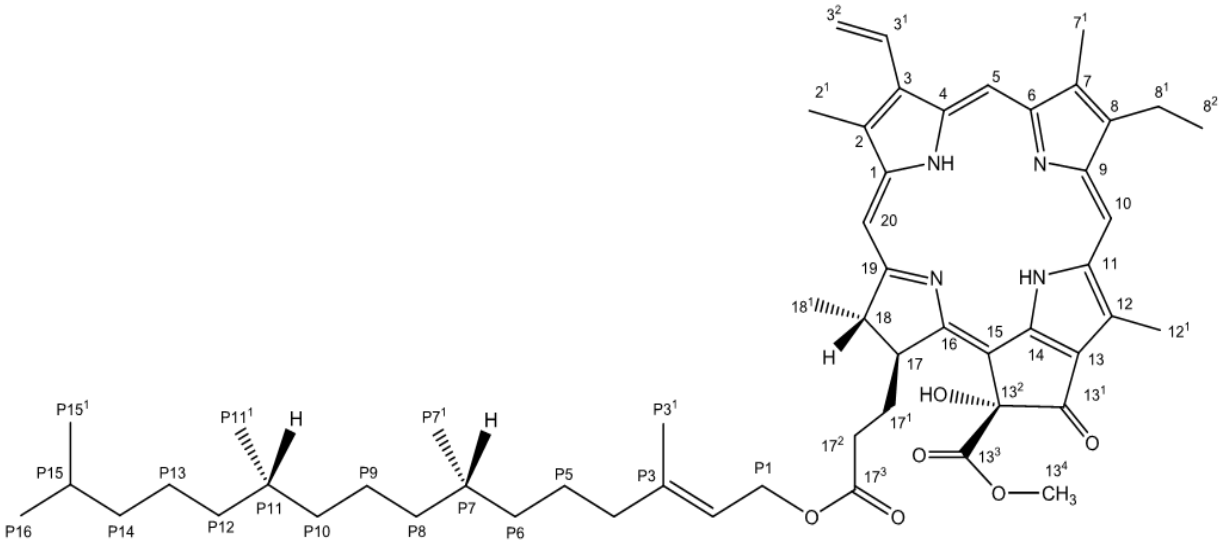


Figura 4. Estrutura química da substância 13^2-hidroxi-(13^2-*R*)-feofitina a

5.2. Atividade antimicrobiana da mistura isolada de *Sargassum vulgare* var. *nanum*

O ensaio de atividade antimicribiana não mostraram atividade antibacteriana para a cepas testadas, no entanto mostraram atividade antifúngica significativa. os ensaios de atividade antifúngica da 13-hidroxi-feofitina estão registrados na **Tabela 3.** **Tabela.3**- Concentração inibitória mínima (µg/mL) da mistura (R,S,13-hidroxifeofitina) sobre espécies de *Candida*- técnica de microdiluição.

Produtos	***C. albicans*** **ATCC 7648**	***C. albicans*** **LM 111**	***C. tropicalis*** **ATCC 13803**	***C.tropicalis*** **LM 14 Fase**
Hexânica	S	S	S	S
Fase diclrometano	S	S	S	S
Fase acetato	R	R	R	R
Fase aquosa	R	R	R	R
Feoftina	S	S	S	S
Controle Levedura	**+**	**+**	**+**	**+**
Nistatina	**-**	**-**	**-**	**+**

+: crescimento do micro-organismo
-: não crescimento do micro-organismo

As espécies de *Candida* apresentaram boa sensibilidade a 13-hidroxi-feofitina**.** A mesma inibiu o crescimento das quatro (04/100 %) cepas utilizadas nos ensaios de atividade antifúngica, onde a CIM de 256 µg/mL. O controle com

antifúngico padrão, no caso, a nistatina a 100 UI/mL, produziu inibição sobre o crescimento de três (75 %) das cepas de *Candida*. Portanto, os resultados podem ser considerados de ótima ou moderada atividade biológica, levando em consideração os parâmetros estabelecidos por Mitcher et al., 1972; Holetz et al., 2002; Houghton et al., 2007.

Tabela 4- Concentração inibitória mínima (µg/mL) da 13-hidroxi-feofitina sobre espécies de bactérias- técnica microdiluição.

Produtos	***S. aureus*** **ATCC 25923**	***S. aureus*** **LM 137**	***P. aeruginosa*** **ATCC 9027**	***P. aeruginosa*** **LM 07**
Fase hexânica	R	R	R	R
Fase diclrometano	R	R	R	R
Fase acetato	R	R	R	R
Fase aquosa	R	R	R	R
Feoftina	R	R	R	R
Controle bactéria	**+**	**+**	**+**	**+**
Cloranfenicol	**-**	**-**	**+**	**+**

+: Crescimento do micro-organismo
- : Não crescimento do micro-organismo

As espécies bacterianas testadas não apresentaram sensibilidade a mistura (R,S 13-hidroxi-feoftina), nem as fases, portanto foram resistentes.

Conclusão

6. CONCLUSÕES

- O presente trabalho atingiu o objetivo o qual foi o estudo ficoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana das fases: hexânica, diclorometânica, acetato, aquosa, como também a feofitina de *Sargassum vulgare var, nanum.* E. de Paula.

- Através de métodos cromatográficos usuais e técnicas espectroscópicas de IV e RMN de ^{1}H e ^{13}C uni e bidimensionais isolou e identificou os constituintes da alga *Sargassum vulgare* var*. nanum.*

- Com a análise dos espectros desta mistura e da análise comparativa com os dados da literatura as substâncias foram identificadas como 13²-hidroxi-(13²-*S*)-feofitina *a* e 13²-hidroxi-(13²-*R*)-feofitina

Perspectivas

7. PERSPECTIVAS

- O estudo ficoquímico será continuado com as outras fases, a fase diclorometano, acetato de etila e *n*-butanólica, e exaurindo anteriormente a fase etérea.

- O isolamento de metabólitos na espécie Sargassum vulgare var. nanum evidencia o potencial deste gênero, gerando perspectivas de investiga-lo posteriormente.

- Diante do que foi apresentado, percebe-se que *Sargassum vulgare* var. *nanum* detém um potencial farmacológico a ser explorado. Dessa forma, espera-se que o estudo das fases hexânica, diclorometânica, acetato de etila, e aquosa possam trazer novos substâncias inéditas, com potencial antimicrobiano maior, as quais serão de grande importância para a farmacologia.

Referências

8. REFERÊNCIAS

AFOLAYAN, A. F.; BOLTON, J. J.; LATEGAN, C. A.; SMITH, P. J. & BEUKES, D. R. Fucoxanthin, tetraprenylated toluquinone, and toluhydroquinone metabolites from *Sargassum heterophyllum* inhibit the in vitro growth of the malaria parasite *Plasmodium falciparum.***Zeitschrift für Naturforschung C: Journal of Biosciences.** v. 63 (11/12): pp. 848-852, 2008.

ALGABASE, 2012. Disponível em <http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=5187 acessado no dia 01 de fevereiro de 2012.

BARREIRO, E. J. & FRAGA, C. A. M. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. 2ª edição, Porto Alegre – RS: **Ed. ArtMed Ltda**, 2008.

BHAKUNI, D.S.&RAWAT, D.S.Bioactive MarineNatural Products. Nova Delhi, India: **Anamaya Publishers**, 2005.

BROSS-WALCH, N.; KÜHN, T.; MOSKAU, D. &ZERBE, O. Strategies and tools for structure determination of natural products using modern methods of NMR spectroscopy.**Chemistry biodiversity.** v. 2 (2) pp. 147-177, 2005.

BUCHANAN, M. S.; HASHIMOTO, T.&ASAKAWA, Y. Phytyl esters and phaeophytins from the hornwort *Megaceros flagellari*s. **Phytochemistry**, v. 41(5): pp. 1373-1376, 1996.

BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products.** v.67 (12): pp. 2141-2153, 2004 16

CANNELL, R. J. P. Methods in Biotechnology 4. Natural Products Isolation. Totowa, NJ: **Ed. Humana Press**, 1998.

CHENNUBHOTLA, V.S.K.; KALIAPERUMAL, N.; KALIMUTHU, S.; SELVARAJ, M., RAMALINGAM, J.R. & NAJMUDDIN, M. Seasonal changes in growth and alginic acid and mannitol contents in *Sargassum ilicifolium* (Tunner) J. Agardh and *S.*

myriocystum C. Agardh. **Indian Journal of Marine Sciences.** v. 11 (2): pp. 195–196, 1982.

CHO, S. H.; CHO, J. Y.; KANG, S. E.; HONG, Y. K. & AHN, D. H.; Antioxidant activity of mojabanchromanol, a novel chromene, isolated from brown alga *Sargassum siliquastrum*. **Journal of Environmental Biology.** v. 29(4): pp. 479-484, 2008.

CHOI, E. Y.; HWANG, H. J.; KIM, I. H. & NAM, T. J. Protective effects of a polysaccharide from *Hizikia fusiformis* against ethanol toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology.** v.47 (4): pp. 134–139, 2009

COIMBRA, C. S. Inferências filogenéticas a ordem Fucales (Phaeophyceae), com ênfase no gênero *Sargassum*. Tese (doutorado). Departamento de Botânica, Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo, São Paulo, 75p, 2006

CROMBIE, L. & WHITING, D. A.Review article number 135 biosynthesis in the rotenoid group of natural products: applications of isotope methodology. **Phytochemistry.** v. 49(6): pp. 1479-1507, 1998.

CROTEAU, R. KUTCHAN, T. M. LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In Buchanan B, Gruissem W, Jones R (Eds.), Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville, MD: **Ed. American Society of Plant Physiologists.** pp. 1250-1318, 2000.

DAVEN'S GARDEN. Disponível em<**http://davesgarden.com/guides/pf/showimage /6748/>.** Acessado no dia 13/11/2011

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products. 3ª edição,West Sussex – Inglaterra: **Editora John Wiley & Sons LTD**, 2009

DONIA, M. & HARMANN, M. T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 3(6): pp. 338-348, 2003. 17

DUAN, H.; TAKAISHI, Y.; MOMOTA, H.; OHMOTO, Y.&TAKI, T. Immunosuppresive constituents from *Saussurea medusa*. **Phytochemistry.** v. 59 (1): pp. 85-90, 2002.

EXARCHOU, V.; KRUCKER, M.; VAN BEEK, T. A.; VERVOORT, J. ; GEROTHANASSIS, I. P. & ALBERT, K. LC–NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis. **Magnetic Resonance in Chemistry.** v.43 (9): pp. 681–687, 2005

FENICAL, W. Halogenation in Rhodophyta a review. **Journal of Phycology.** v. 11(3): pp. 245, 1975.

FOREST&STARR.Disponívelem<**http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cinchona_officinalis_%28K%C3%B6hler%29.jpg** >. Acessado no dia 13/11/201.

GLOMBITZA, K. W. & SCHMIDT, A. Nonhalogenated and Halogenated Phlorotannins from the Brown Alga *Carpophyllum angustifolium*. **Journal of Natural Products.**v. 62 (9): pp. 1238-1240, 1999.

GUVEN, K. C. & GUVEN, N. Analysis of protein fractions obtained from *Sargassum vulgare*. **Eczacilik Bulteni.** v. 17(1), pp. 13-16, 1975.

HAJDU, E.; BERLINCK, R. G. S. & FREITAS, J. C. Biodiversidade do Estado de São Paulo. Síntese do Conhecimento ao Final do Século XX: Invertebrados marinhos. 1a ed. Brasil: **Editora FAPESP.** v. 4, pp.20-30 1999.

HALKET, J. M.; LISBOA, BELIZARIO P. & PINHEIRO-JOVENTINO, F. The major sterols of *Sargassum vulgare* C. Agardh investigated by mass chromatography. **Arquivos de Ciencias do Mar.** v. 16(2), pp. 117-22, 1976.

HAM, Y. M.; KIM, K.; LEE, W. J.; LEE, N. H. & HYUN, C. Chemical constituents from *Sargassum micracantum*and antioxidant activity. **Internacional Journal of Pharmacology.**6(2), pp. 147-151, 2010.

HEATON, J. W. & MARANGONI, A. G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends in Foods Science & Technology.** v.7 (1): pp.8-15, 1996.

HÖRTENSTEINER, S. Chlorophyll Degradation During Senescence. **Annual Review of Plant Biology.** v. 57(s/n): pp.55–77, 2006. 18

HUANG, X.; LI, M.; XU, B.; ZHU, X.; DENG, Z.& LIN, W. Proteasome and NF-κB inhibiting phaeophytins from the green alga *Cladophora fascicularis*. **Molecules**, v. (3):pp. 582-592, 2007.

HWANG,H.; KIM, I. & NAM, T. Effect of a glycoprotein from *Hizikia fusiformis* on acetaminophen-induced liver injury. **Food and Chemical Toxicology.** v. 46 (11): pp. 3475–3481, 2008

INA, A.; HAYASHI, K.; NOZAKI, V. & KAMEI, Y. Pheophytin a, a low molecular weight compound found in the marine brown alga *Sargassum fulvellum*, promotes the differentiation of PC12 cells. **International Journal of Developmental Neuroscience.** v. 25 (1): pp. 63–68, 2007.

IWASHIMA, M.; TAKO, N.; HAYAKAWA, T.; MATSUNAGA, T.; MORI, J. & SAITO, H. New Chromane Derivatives Isolated from the Brown Alga, *Sargassum micracanthum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin.** v. 56(1): pp. 124-128, 2008.
JERZ, G.; ARREY, T. N.; WRAY, V.; DU, Q.& WINTERHALTER, P. Structural characterization of 132-hydroxy-(132-S)-phaeophytin-a from leaves and stems of *Amaranthus tricolor* isolated by high-speed countercurrent chromatography. **Innovative Food Science and Emerging Technologies.** v. 8 (3): pp. 413–418, 2007

JIN, Z. Review Imidazole, oxazole and thiazole alkaloids. **Natural Product Reports.** v. 22(6): pp. 196–229, 2005.

LAMBERT,M.; WOLFENDER, J.; STÆRK,D.; CHRISTENSEN, S. B.; HOSTETTMANN,K.&JAROSZEWSKI, J. W.Identification of Natural Products Using

HPLC-SPE Combined with CapNMR. **Analytical Chemistry.**v. 79 (2): pp 727-735, 2007.

LANGE, B. M. &CROTEAU, R. Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: Isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v. 96(24): pp. 13714-13719, 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. & COX, M. M. Princípios de bioquímica. 5. ed. Porto Alegre - RS : **Editora Artmed**, 2011. 19

CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evalution of new antimicrobials "*in vitro*" and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine.** Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bactéria. **Planta Medica,** v. 64, p. 711-713, 1978.

HADACEK, F. GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HOLETZ, F. B.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal ofEtnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.

NAQVI, S. H.; KILIAN, M. S. Y.; VOHORA, S. B. Anti-bacterial, antifungal and antihelmintec investigations on Indian medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 62, n. 3, p. 221-228, 1991.

NATTIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS. Perfomance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7 ed.Villanova. PA: NCCLS, 2000.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.

WOUNG-LEUNG, Y. L.Antimicrobial activities of some Hon-Kong plants used in chinese medicine. **Fitoterapia**, v. 69, n.1, p. 11-16, 1988. MANN, C. M., MARKHAM, J. L. A. New method of determining the minimum inhibitoy concentration of essencial obs. **Jrernal of appliecl microbiology**, v. 84, p.538-544, 1998