

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Raul Moreira Oliveira

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE
Maytenus ilicifolia (Mart. ex Reissek)**

Santa Maria, RS
2016

Raul Moreira Oliveira

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DE *Maytenus ilicifolia* (Mart. ex Reissek)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da
Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM, RS) como requisito parcial para
obtenção do grau de **Mestre em
Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Oliveira, Raul Moreira

Análise fitoquímica e avaliação das atividades
antioxidante e antimicrobiana de *Maytenus ilicifolia*
(Mart. ex Reissek) / Raul Moreira Oliveira.-2016.

56 p.; 30cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2016

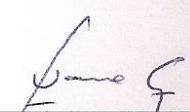
1. *Maytenus ilicifolia* 2. Plantas medicinais 3.
Espinheira-Santa 4. Atividade antioxidante 5. Atividade
antimicrobiana I. da Cruz, Ivana Beatrice Mânica II.
Título.

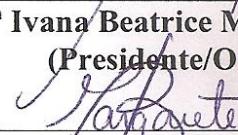
Raul Moreira Oliveira

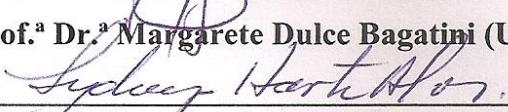
**ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DE *Maytenus ilicifolia* (MART. ex REISSEK)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Toxicológica.

Aprovado em 26 de Janeiro de 2016:


Prof.ª Dr.ª Ivana Beatrice Mânic da Cruz (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Prof.ª Dr.ª Margarete Dulce Bagatini (UFFS)


Prof. Dr. Sydney Hartz Alves (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a minha família por acreditar em mim, me apoiar sempre que necessário e sempre estar disposta a ajudar em qualquer tipo de situação.

Agradeço a todos os professores que tive durante a educação básica, durante a graduação e durante o mestrado, que me inspiraram a seguir a carreira acadêmica e chegar onde estou hoje.

Quero agradecer a todos os colegas e amigos que conheci durante os anos em que morei em Santa Maria. Não citarei nomes, por receio de acabar esquecendo alguns, mas não posso deixar de agradecer em especial a Micheli Jobim, por toda a ajuda na realização deste trabalho, e a Danise, Tális, Thaís e Pauline. Citarei também duas pessoas incríveis que eu tive a oportunidade de conhecer, Rafael Dias Ferreira e Clarice Pinheiro Mostardeiro (*in memoriam*), que ficarão para sempre em meu coração por tudo que me ensinaram, não só academicamente, mas como exemplo de pessoas que foram.

A professora Dra. Ivana da Cruz, que me acolheu em seu laboratório e me transferiu um pouco de seu vasto conhecimento, sou eternamente grato pelo seu exemplo como pesquisadora, assim como aos colegas do Laboratório de Biogenômica.

Ao professor Dr. Roberto Christ pela co-orientação e por permitir a realização deste trabalho em seu laboratório, assim como a todos os seus alunos do Laboratório de Microbiologia da UNIFRA, em especial a Márcia Ebling por toda a ajuda na parte experimental.

A Maria Fernanda pela co-orientação não só neste trabalho, mas também durante minha iniciação científica e a Grazielle, Beatriz e Audrei, por todo o auxílio para que este trabalho fosse concluído.

Ao PPG Bioquímica Toxicológica da UFSM.

A CAPES pela bolsa de pesquisa.

E, finalmente, a todos que direta e indiretamente tornaram este trabalho possível.

Meu muito obrigado!

RESUMO

ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE *Maytenus ilicifolia* (Mart. ex Reissek)

AUTOR: Raul Moreira Oliveira

ORIENTADORA: Ivana Beatrice Mânicca da Cruz

A Organização Mundial da Saúde reconhece a relevância do uso de plantas medicinais pela população para tratar algumas doenças, entretanto, em algumas espécies de plantas, ainda é comum o uso das folhas em diferentes preparações sem nenhum critério e avaliação prévia da eficácia e segurança de cada preparo de infusão. Este é o caso da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (Celastraceae) conhecida como Espinheira-santa. Popularmente, esta espécie é preparada na forma de infusão utilizando ou folhas frescas ou folhas secas. Assim o objetivo deste estudo foi avaliar a existência da potencial diferença dos extratos de folhas secas e frescas de *M. ilicifolia* quanto à composição de moléculas bioativas, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana frente 12 cepas bacterianas. Além disso, o efeito dos extratos da *M. ilicifolia* sobre a modulação das EROS nas bactérias também foi investigado. Foram obtidos extratos hidroalcoólicos usando folhas frescas e secas de *M. ilicifolia* e a quantificação de oito moléculas bioativas foi realizada através da técnica de HPLC-DAD. Os extratos produzidos com folhas secas de *M. ilicifolia* apresentaram a maior concentração de compostos bioativos (principalmente quercetina e ácido cafeico), bem como uma maior eficiente atividade antibacteriana, apesar de a capacidade antioxidante ser maior no extrato de folhas frescas. Ambos os extratos em diferentes concentrações reduziram os níveis de EROS. As atividades antibacteriana e antioxidante foram observadas concomitantemente nos extratos de *M. ilicifolia*. Os resultados sugerem que o decréscimo dos níveis de EROS pode causar citotoxicidade por estresse redutivo ou agir como inibidor na sinalização da proliferação das bactérias. Estudos complementares precisam ser realizados para corroborar esta hipótese. Os resultados aqui apresentados podem ser relevantes, uma vez que mostram um importante impacto na preparação das folhas sobre a extração de alguns compostos e na atividade biológica de *M. ilicifolia*.

Palavras-chave: *Maytenus ilicifolia*. Atividade Antioxidante. Atividade Antimicrobiana. Plantas Medicinais.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND EVALUATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF *Maytenus ilicifolia* (MART. ex REISSEK)

AUTHOR: Raul Moreira Oliveira

ADVISOR: Ivana Beatrice Mânic da Cruz

Despite the World Health Organization recognize the relevance of medicinal plants use by population to treat some health conditions, in some plant species, leaves are prepared from different forms without any criteria and previous efficacy and safety evaluation of each infusions preparation. This is the case of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (Celastraceae), popularly known as Espinheira-Santa. Popularly, this specie is used as infusion prepared from fresh or dried leaves. Therefore, the aim of this study was to evaluate the existence of potential differences of *M. ilicifolia* fresh and dried leaves extracts on bioactive molecules composition, antioxidant capacity and antimicrobial activity against 12 bacteria strains. Moreover, the effect of *M. ilicifolia* extracts on reactive oxidative species (ROS) modulation of bacteria were also investigated. Hydroalcoholic extracts using fresh and dried *M. ilicifolia* leaves were obtained and the quantification of eight bioactive molecules was performed by HPLC-DAD protocols. Antioxidant capacity and antibacterial effect were also evaluated. The *M. ilicifolia* extract produced from dried leaves presented higher concentration of bioactive compounds (mainly quercetin and caffeic acid), as well as a more efficient antibacterial activity despite the antioxidant capacity to be higher in fresh leaves extract. Both extracts at different concentrations decreased ROS levels. As concomitant antibacterial and antioxidant activities were observed in *M. ilicifolia* extracts, the results suggest that decreasing of ROS levels could cause cytotoxicity by reductive stress or to act as inhibitory signaling of bacteria proliferation. Complementary studies need to be perform to corroborate this hypothesis. The results presented here could be relevant, since show important impact of leaves preparation on extraction of some chemical compounds and the biological activities of *M. ilicifolia*.

Key-words: *Maytenus ilicifolia*. Antioxidant Activity. Antimicrobial Activity. Medicinal Plants.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i> . Espinhos em destaque.....	13
Figura 2 – <i>Maytenus ilicifolia</i> (A) árvore, (B) fascículos multifloros, (C) frutos.....	15

MANUSCRITO

Figure 1 - Representative high performance liquid chromatography profile of Espinheira-Santa.....	12
Figure 2 - Comparison of antioxidant capacity determined by DPPH assay between dried and fresh leaves of <i>M. ilicifolia</i> using rutin as control antioxidant molecule.....	13
Figure 3 - Kill-kinetics curves for <i>Salmonella enteritidis</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> exposed to dried and fresh <i>M. ilicifolia</i> extracts.....	15
Figure 4 - ROS levels of 12 bacteria treated at different concentrations of <i>M. ilicifolia</i> dried and fresh leaves extracts.....	18

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 PLANTAS E SEU USO MEDICINAL NA HISTÓRIA DA HUMANIDADE	9
1.2 PLANTAS MEDICINAIS	11
1.3 <i>Maytenus ilicifolia</i>	13
1.3.1 Classificação taxonômica	13
1.3.2 Composição química	16
1.3.3 Propriedades farmacológicas	16
1.4 ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 METODOLOGIA E RESULTADOS	22
3.1 MANUSCRITO	22
4 DISCUSSÃO	45
5 CONCLUSÃO	47
6 BIBLIOGRAFIA	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS E SEU USO MEDICINAL NA HISTÓRIA DA HUMANIDADE

O uso de plantas, principalmente superiores, com propriedades terapêuticas é uma das práticas mais antigas empregadas pelo homem, seja na prevenção, tratamento e cura de doenças ou em rituais das mais diversas finalidades. Inicialmente essas eram utilizadas na forma bruta, tais como tinturas, chás, emplastros, pós e outras formulações a base de vegetais (ALZUGARAY e ALZUGARAY, 1996).

O registro do uso de plantas está datado desde os primórdios da civilização. Várias espécies bem conhecidas, como a mirra (*Commiphora* sp.), o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) e a papoula (*Papaver somniferum*) foram referidas em tabuletas de argila de 2600 a.C. encontradas na Mesopotâmia, e são utilizadas até os dias de hoje, seja como fármacos com seus princípios ativos ou preparações com a própria planta (NEWMAN et al., 2000; BALICK & COX, 1997). Outro relato, de aproximadamente 3000 a.C., é a obra do imperador chinês *Cho-Chi-Kei*, de relativa importância para a farmacognosia oriental e que trás em destaque o Ginseng (*Panax ginseng*) como a cura de diversas doenças, além de outras plantas como o ruibarbo (*Rheum* sp.), o acônito (*Aconitum napellus*) e a cânfora (*Cinnamomum camphora*) (ALZUGARAY e ALZUGARAY, 1996).

Os povos egípcios cultivavam diversas plantas com a finalidade de utilizá-las como purgantes, vermífugos, diuréticos e cosméticos, como está registrado no *Papyrus Ebers*, um inventário de 700 espécimes datado de 1600 a.C. (PELT, 1979). Existem também relatos de uso de *Hyoscyamus niger*, que é rica em atropina, pela rainha Cleópatra com a finalidade de dilatar a pupila para intimidar adversários políticos em discussões. (CROTEAU et al., 2000).

Na Grécia e Roma antiga, houve grandes contribuições no desenvolvimento de fármacos de origem vegetal. Hipócrates (300 a.C.), o pai da medicina, em seus textos cita entre 300 a 400 plantas. Dióscorides descreve o uso terapêutico de aproximadamente 600 ervas em sua enciclopédia e farmacopeia *De Materia Medica* (\pm 70 d.C.), sendo grande parte destas, de importância na medicina moderna, como por exemplo é o açafrão-do-prado (*Colchicum autumnale*), do qual é extraído a colchicina utilizada no tratamento da gota e a *Aloe vera* (babosa) usada em cosméticos. Galeno (200 d.C.) deixou mais de duzentos escritos sobre plantas medicinais e é tido como o pai da farmacêutica. Na mesma época viveu Plínio, que afirmou em seu compilado de inúmeros tratados gregos e romanos, *História Natural*, que todas as plantas que não são visivelmente úteis como alimento, roupa e abrigo, podem possuir

propriedades medicinais. Há também registros de uso de plantas, como a erva-do-soldado (*Achillea millefolium*) para conter hemorragias e curar feridas dos soldados romanos. Além de uso como fármaco, há registros do uso de plantas venenosas contra inimigos ou em execuções, como a cicuta (*conium maculatum*) (ALZUGARAY e ALZUGARAY, 1996; SEGREDOS, 1999; CROTEAU et al., 2000).

Durante a Idade Média, a Igreja controlou praticamente todo o conhecimento médico (a Inquisição e as Cruzadas), tornando a medicina uma extensão de suas doutrinas e desacreditando boa parte do progresso dos estudiosos não cristãos. É importante ressaltar que a Igreja estimulou dois grandes avanços na área médica no período medieval, o hospital e as escolas universitárias de medicina (SEGREDOS, 1999).

Foram os árabes, neste mesmo período, que preservaram e fizeram muitos aperfeiçoamentos às obras greco-romanas, e foram os responsáveis em distinguir a medicina da farmacêutica, contribuindo para a difusão de várias plantas medicinais. Avicena (ou *Ibn Sīnā*. 978-1037) em seu *Cânone da Medicina*, compilação de 5 livros usados como didáticos por toda a Europa até o século XVII, trazia não só informações provenientes em Galeno e Dióscorides, como acrescentava plantas e drogas utilizadas por culturas árabes, persas e indianas (SEGREDOS, 1999; PEIXOTO NETO e CAETANO, 2005).

Já no final da Idade Média, o suíço Paracelso destacou-se por ter descoberto inúmeras drogas utilizadas na atualidade, como os opióides, e foi um dos primeiros a defender a importância da química na preparação de medicamentos. Paracelso é considerado um dos principais responsáveis pelo avanço da terapêutica, lançando as bases da medicina natural (PEIXOTO NETO & CAETANO, 2005).

O tratamento de doenças com preparos farmacêuticos a base de vegetais foi a ferramenta principal da terapêutica até meados do século XIX. Nos anos seguintes, com o desenvolvimento de processos industriais de fabricação e sintetização de medicamentos, o uso de plantas medicinais foi deixado em segundo plano pelas grandes corporações farmacêuticas, uma vez que na produção de medicamentos sintéticos se tem um maior controle de todas as etapas de industrialização, o que não ocorre nos fitoterápicos, pois sua matéria-prima está sujeita a variações em suas características devido fatores como clima, solo, incidência de doenças e pragas, ou até mesmo o método de cultivo e coleta (ATTISSO, 1979).

1.2 PLANTAS MEDICINAIS

Segundo a OMS, a definição de planta medicinal é todo e qualquer vegetal que contenha substâncias que possam ser usadas com fins terapêuticos ou que sejam precursoras de fármacos semissintéticos (WHO, 2002). Atualmente, apesar do grande interesse em modelagem molecular, química combinatória e outras técnicas de química sintética por companhias farmacêuticas e organizações de financiamento, os produtos naturais, e particularmente as plantas medicinais, continuam sendo importantes fontes de novas drogas, pistas para novos sintéticos e novas entidades químicas (BUTLER, 2004).

A diversidade de plantas existentes no planeta e o conhecimento sobre elas, do ponto de vista científico é muito pequeno e menor ainda é o número de espécies que possuem estudos fitoquímicos e avaliações sobre os aspectos biológicos (SIMÕES, 2002). Segundo o Atlas Mundial da Biodiversidade, elaborado pela OMS, até o ano 2000 se avaliou o potencial farmacêutico de apenas 1% das 250 mil plantas existentes no mundo (ZACHÉ, 2001). Muitas delas são utilizadas empiricamente, sem muita informação científica quanto sua eficácia e segurança. Uma vez que seu uso se dá principalmente na forma de automedicação, pode ocorrer identificação errônea da planta, comprometimento da eficácia do tratamento, e levar a efeitos adversos ou indesejados, inclusive efeitos tóxicos e até mesmo a morte. Por estes motivos, estudos sobre atividade de plantas tidas como medicinais possuem uma grande relevância para a saúde (FARNSWORTH, 1985).

Estima-se que cerca de 87% das doenças humanas categorizadas podem ser tratadas com medicamentos derivados de produtos naturais, sendo que as plantas medicinais representam as maiores fontes de substâncias ativas que podem ser usadas na terapêutica devido a grande diversidade estrutural de metabólitos (NEWMAN et al., 2003). Em comparação com os animais, os vegetais são bioquimicamente avançados, produzindo não só, todas as moléculas requeridas para seu metabolismo primário (respiração, fotossíntese, lipídeos, proteínas, síntese de ácidos nucléicos), como componentes de metabolismo secundário (PIP, 2006).

Os compostos secundários aparentemente não desempenham função no metabolismo primário das plantas, estando associados mais ao seu papel ecológico. Alguns exemplos são: carotenos e antocianinas que atuam como atrativos de polinizadores; mucilagens e gomas que são adaptações químicas ao estresse ambiental, como a baixa disponibilidade de água; alcaloides, taninos, terpenos e glicosídeos, que fazem parte da defesa contra microrganismos, insetos, herbívoros e até mesmo outras plantas. Quando

essas moléculas possuem a capacidade de exercer efeitos fisiológicos de propriedade terapêutica, são designados como princípios ativos (FLÜCK, 1954; JANZEN, 1980; COLEY et al., 1985; BALANDRIN et al., 1985; ROBBERS et al., 1997).

A maneira de consumir as plantas medicinais varia de acordo com as partes vegetais utilizadas, com a finalidade do uso, interesse de compostos extraídos e também de acordo com a cultura popular de cada região (AKELERE, 1992). Na maioria dos casos, essas plantas são utilizadas na forma de chás, que são extrações aquosas através de infusão, decocção ou maceração, mas existem também extrações com diferentes solventes e diferentes processos, como por digestão, percolação e destilação (HANDA, 2008).

A infusão é indicada para flores e folhas macias e consiste da adição de água fervente sobre as mesmas e então é abafado por alguns minutos, coado e bebido ainda morno. Na decocção, a planta é fervida junto à água e é recomendada para folhas duras, cascas, sementes e raízes. O processo de maceração é usado para partes em geral da planta, sendo deixado em contato com o solvente (água, etanol, metanol ou outro) em temperatura ambiente por no mínimo dois dias. A digestão, uma variação da maceração, a diferença está em manter em aquecimento moderado em torno de 40 °C a 60 °C (EMATER, 2012).

A percolação consiste da passagem do solvente através da planta moída, utilizando um equipamento (percolador) onde o fluxo e a mistura de líquidos extratores são controlados, otimizando a extração. Na destilação, o extrato líquido, geralmente obtido após a maceração, é submetido à destilação em um rotaevaporador até a concentração de um extrato seco devido a evaporação total do solvente (HANDA, 2008).

Entre os diferentes solventes, os mais utilizados para extrações, em ordem de polaridade, e o tipo de substâncias extraídas são: o éter de petróleo e hexano (lipídeos, ceras, pigmentos, furanocumarinas), tolueno, diclorometano, clorofórmio e acetona (bases livres de alcaloides, antraquinonas livres, óleos voláteis), acetato de etila, acetonitrila e n-butanol (flavonoides e cumarina), etanol e metanol (heterosídeos em geral) e misturas hidroalcoólicas e água (saponinas e taninos) (HANDA, 2008).

Embora tenha ocorrido uma grande evolução de fármacos alopáticos a partir da segunda metade do século XX, aproximadamente 80% da população mundial depende principalmente da medicina tradicional para seus cuidados primários de saúde (AKELERE, 1992; VEIGA JUNIOR et al., 2005). O uso dessas plantas medicinais tem um papel importante na saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos. Isso se deve, em parte, a obstáculos básicos na utilização da medicina alopática por populações carentes, como a dificuldade de acesso aos centros de atendimento hospitalares, a obtenção de exames e

medicamentos, bem como a disponibilidade e a grande tradição do uso de plantas, colaboram para a manutenção dessa realidade (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

No Brasil, estima-se que 60% da população faça uso de plantas medicinais, mesmo com o mercado brasileiro estando entre o quarto e o quinto lugar no consumo alopático mundial. No final da década de 90, menos de um quarto dos brasileiros apenas eram responsáveis por consumir 60% dos remédios comercializados (LAPA et al. 1999).

Dentro desse contexto, é importante investigar as plantas e extratos medicinais utilizadas no país, como é o caso da espinheira-santa.

1.3 *Maytenus ilicifolia*

1.3.1 Classificação taxonômica

A *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, uma planta da família Celastraceae, é conhecida popularmente por diversos nomes, dentre eles: “espinheira-santa”, “cancerosa”, “cancorosa”, “erva-cancerosa”, “espinheira-divina”, “cancorosa-de-sete-espinhos” e “maiteno”. Os nomes fazem referência, principalmente, ao aspecto das folhas que possuem bordas com espinhos (Figura 1) (SEGREDOS, 1999; LORENZI e MATOS, 2002). No Brasil, Reissek (1881) foi o responsável por desenvolver estudos taxonômicos da família Celastraceae, abrangendo todo o território nacional.

Figura 1 – Folhas de *Maytenus ilicifolia*. Espinhos em destaque.



Fonte: Arquivo pessoal. Foto: Raul Moreira Oliveira.

A família Celastraceae apresenta indícios de sua origem no final do período Cretáceo (68 milhões de anos atrás) (ESTRADA-RUIZ et al., 2012). Engloba 98 gêneros e aproximadamente 1264 espécies, encontradas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, com poucos gêneros nas regiões temperadas. Compreende plantas lenhosas, arbóreas, ou arbustos, com folhas inteiras, sem estípulas e com disposição alterna ou oposta, e flores hermafroditas ou unissexuais, pequenas e de simetria radial (CRONQUIST, 1981; JOLY, 1998).

Esta família apresenta espécies com relativa importância terapêutica, possuindo uma grande variedade de propriedades farmacológicas, como ação imunossupressora, antiulcerogênica, inseticida, antibacteriana, antirreumática e cicatrizante e tendo como principais substâncias constituintes mantansinóides, triterpenos quinóides, dímeros triterpenos, alcaloides piridínicos, sesquiterpenos, flavonóides glicosilados e catequinas (SHIROTA et al. 1994; FONSECA et al., 2007).

O gênero *Maytenus* destaca-se dentro da família Celastraceae. Possuindo 200 espécies, a maioria ocorre na América do Sul e 47 delas estão presentes no Brasil, principalmente na região sul. O nome *Maytenus* vem de Maytén, uma planta utilizada pelos Mapuches, indígenas do Chile e Argentina. Muitas espécies desse gênero são usadas na medicina popular, como é o caso da *Maytenus ilicifolia*. Segundo o uso popular, essa planta pode tratar diversas doenças, sendo indicada principalmente para gastrites e dispepsias, além de ser usada pelos índios nativos no tratamento de tumores (CARVALHO-OKANO, 1992; MOSSI et al., 2004; REIS & SILVA, 2004).

A *M. ilicifolia* é encontrada predominantemente na região sul do Brasil, no Paraguai, Uruguai e na Argentina, ocorrendo no interior de matas nativas e em matas ciliares. Tem preferência por solos argilosos e com alto teor de matéria orgânica e desenvolve-se melhor em áreas onde a floresta não é muito densa e há maior luminosidade (sub-bosques) (ROSA, 1994; MAGALHÃES, 2004).

É uma espécie arbóreo-arbustiva, geralmente atingindo cinco metros de altura e ramificada desde a base, com ramos glabros (sem pelos ou tricomas) angulosos e tetra ou multicarenados. Suas folhas, com inserção alternada helicoidal, são simples, congestas, coriáceas e lanceoladas mucronadas, com cristais de oxalato de cálcio nas células epidermais e camada de cutícula espessa; estípulas inconspicuas; pecíolo com 0,2 a 0,5 cm de comprimento; limbo com 2,2 a 8,9 cm de comprimento e 1,1 a 3,0 cm de largura; nervuras

proeminentes na face abaxial; margem inteira ou com espinhos distribuídos regular ou irregularmente no bordo, geralmente concentrados na metade apical. As inflorescências são distribuídas em fascículos multifloros; pedicelos com 0,2 a 0,5 cm de comprimento; sépalas ciliadas e semicirculares, com aproximadamente 0,1 cm de comprimento; pétalas ovais de cerca de 0,22 cm de comprimento e 0,2 cm de largura; estames com filetes achatados na base; estigma é capitado, séssil ou com estilete distinto; ovário saliente ou totalmente imerso no disco carnoso; flores aparentemente monoclinas, porém existem evidências de que tenham funcionamento diclino. O fruto é tipo capsula bivalvar, orbicular, com pericarpo maduro apresentando coloração vermelho-alaranjada (Figura 2) (CARVALHO-OKANO, 1992; MAGALHÃES, 1997).

Figura 2 – *Maytenus ilicifolia* (A) árvore, (B) fascículos multifloros, (C) frutos.



Fonte: Arquivo pessoal. Foto: Raul Moreira Oliveira

A padronização botânica é muito importante quando se trata de fitoterápicos. Estima-se que 40% das plantas comercializadas como *M. ilicifolia* sejam na verdade outras espécies devido à similaridade morfológica entre as folhas: *Sorocea bomplandii* (Moraceae), *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae) e *Maytenus aquifolium* (Celastraceae), todas com bordas espinhosas. A diferença entre a *M. ilicifolia* e a *M. aquifolium*, por exemplo, é que a segunda apresenta estrias longitudinais no caule e nos ramos e as folhas possuem inserção paralela, e não helicoidal; as folhas e ramos de *S. bomplandii* apresentam uma seiva na forma de látex

quando partidos e *Z. ilicifolia* apresenta estípulas (JACOMASSI, 2000; SCHEFFER et al., 2004). Além disso a *Z. ilicifolia* apresenta glicosídeos cianogênicos, o que é um fator preocupante devido a toxicidade dos mesmos. No entanto, não existem muitos estudos comparativos entre a eficácia dessas espécies. (COELHO et al. 2003).

1.3.2 Composição química

A *M. ilicifolia* tem sido o táxon mais estudado e explorado economicamente, existindo vários estudos sobre sua composição química. Nesta planta foram encontrados os elementos químicos iodo, sódio, enxofre, fósforo e, em grande quantidade, o cálcio. Vários grupos fitoquímicos estão presentes como flavonóides, taninos, terpenóides, óleos essenciais, glicosídeos e alcaloides. Dentre os flavonóides heterosídicos, os encontrados são: o hiperósideo (quercetina-3-Gal), a quercitrina (quercetina-3-ramnose), a isoquercitrina (quercetina-3-Glu), a quercetina-3-ramno-hexose, a quercetina-3-di-(ramno)-hexose, a rutina (quercetina-3-Glu-ram), o canferol-3-hexose, o canferol-3-ramno-hexose, o canferol-3-di-(ramno)-hexose e o canferol-3-pentose-ramnose. Os taninos são: a Procianidina B₁ (epicatequina-(4β→8)-catequina), a Procianidina B₂ (epicatequina-(4β→8)-epicatequina), epigallocatequina e epigallocatequina-3-galato. Dentre os terpenóides, encontra-se: a maitenina, a pristimerina, a triangenona, a isotenginona II, o ácido maitenóico, os triterpenos dímeros congorosina A e B e os triterpenos friedelanol, friedelina, maytefolinas A, B e C e uvaol-3-cafeato. O friedelenol, o estigmasterol, o esqualeno, a vitamina E, o fitol, o ácido dodecanoico e o acetato de geranila estão entre os óleos essenciais e compostos voláteis. Dentre os glicosídeos, a espinheira-santa apresenta: ilicifolinosídeos A, B e C, mono-, di-, tri- e tetragalactosildiacilglicerol e sulfoquinovosildiacilglicerol. Os alcaloides são: maiteina, maitanprina, maitensina, cafeína e ácido clorogênico. A *M. ilicifolia* apresenta também ácido cafeico e ácido gálico (STELLFELD, 1934; SIMÕES et. al, 1988; MOSSI et al., 2004; OHSAKI et al. 2004; MENDES et al., 2006; PESSUTO, 2006; TIBERTI et al. 2006).

1.3.3 Propriedades farmacológicas

Diversos estudos já confirmaram os efeitos biológicos da espinheira-santa em distúrbios de natureza gástrica. Sua atividade contra a úlcera péptica e gastrite credita-se a não só um princípio ativo em específico, mas sim um efeito sinérgico de seus compostos, como demonstrou o estudo de Queiroga (2000) sobre o fato da friedelina e o friedelanol, quando isolados, não terem ação antiulcerogênica. Entre as moléculas ativas os taninos, os polissacarídeos e os óleos essenciais os principais responsáveis por parte desses efeitos (MING et al., 1998; BERSANI-AMADO et al., 2000; QUEIROGA et al., 2000; CIPRIANI et al. 2004).

Há mais de um mecanismo de ação dessa atividade gastroprotetora da espinheira-santa. Entre eles o mecanismo pelo efeito inibitório do extrato aquoso sobre os mediadores H₂ da histamina nas células parietais estomacais, impedindo que estes mediadores sejam estimulados a aumentar a secreção gástrica, e existe também um efeito inibitório da gastrina (FERREIRA et al., 2004). Em trabalhos utilizando o modelo de indução de úlcera pela indometacina, em roedores, verificou-se efeitos do extrato aquoso, hidroalcoólico e também infusão (chá) da espinheira-santa semelhantes e em alguns casos até superiores ao de fármacos inibidores da histamina, como a cimetidina e ranitidina, sendo a planta menos nociva a parede intestinal por aumentar o pH e volume do suco gástrico (CARLINI e FROCHTENGERTEN, 1988; SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; TABACH & OLIVEIRA, 2003).

Algumas moléculas bioativas da espinheira-santa, como os taninos gálicos, apresentam função de inibidores da bomba de prótons, a etapa final comum das vias reguladoras de secreção ácida, por inibição competitiva da ATPase de membrana potássio-dependente (BOSSOLANI, 2000) ou por uma inibição não competitiva (MURAKAMI, et al., 1992; ANNUK et al., 1999). Sugerindo, assim, dois mecanismos de ação.

Um quarto mecanismo sugerido está relacionado à ação de taninos derivados de catequina contra *Helicobacter pylori*, bactéria frequentemente presente em quadros de inflamação e ulceração da mucosa gástrica, atuando em relação à adesão do microrganismo na mucosa, dificultando sua fixação e, portanto, impedindo a ação patogênica (ANNUK et al., 1999)

Estudos etnicofarmacológicos mostraram o uso popular na forma de chá da espinheira-santa por mulheres como método contraceptivo, abortivo e emenagogo e a sua atividade na regulação da fertilidade. Verificou-se uma diminuição da pré-implantação embrionária, sugerindo interferências na parede uterina que acabam por dificultar a aderência

do embrião, porém não há efeitos após a implantação nem na organogênese, nem efeitos teratogênicos (MONTANARI & BEVILACQUA, 2002; REF). Os resultados de testes com flavonóides e taninos isolados da espécie mostraram-se negativos como contraceptivos e abortivos, descartando esses compostos como os responsáveis por interferir na receptividade uterina ao embrião (MANDICH et al., 1984). Durante a lactação, Viera & Albuquerque (1998) apontam indícios de que a ingestão de chá (infusão) desta planta cause diminuição do leite materno. Em relação à fertilidade masculina, o extrato etanólico não prejudicou a espermatozogênese embora haja leves alterações, como células germinativas imaturas esfoliadas e aumento de gotículas lipídicas em células de Sertoli (MONTANARI et al., 1998).

A *M. ilicifolia* apresenta atividade antioxidante, principalmente contra peroxidação lipídica, e ação quelante de metais pesados. Os polifenóis derivados da catequina são potentes antioxidantes, tendo atividade maior sobre o trato gástrico, pois acabam inibindo a lesão de células da mucosa por EROs gerados na digestão, e tendo também uma ação antimutagênica contra agentes genotóxicos que podem induzir a transformações malignas dessas células (HO et al., 1992; KRUL et al., 2001; MELO et al., 2001). O extrato de folhas de espinheira-santa não possui atividade mutagênica, pois apesar da quantidade de flavonoides que possuem esse efeito, os taninos apresentam características antioxidantes, antimutagênicas e anticarcinogênicas (VARGAS et al., 1989).

Em tumores experimentais, encontrou-se atividade inibitória do terpeno maitenina sobre o sarcoma 180 e o sarcoma de Yoshida (SANTANA et al., 1971). Já o alcalóide maitensina demonstrou ação em linhagens de células neoplásicas, como Leuk-P 338 (leucemia) e CA 9KB (carcinoma epidermoide de nasofaringe) (KUPCHAN e KARIM, 1976). Esse efeito se deve pela capacidade da maitensina em inibir a polimerização da tubulina, afetando a atividade dos centrômeros na formação dos fusos acromáticos durante a divisão celular, impedindo então que as células cancerosas se reproduzam (ALONSO, 1998). Alguns taninos, como a epigalocatequina e a epigalocatequina-3-galato, inibem a liberação de TGF β e a expressão de NF- $\kappa\beta$, ambos relacionados com a carcinogênese (OKABE et al., 1999). A epigalocatequina-3-galato também apresentou a ação de inibir a indução de câncer gástrico por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanida, sendo este efeito atribuído à inibição da ornitina descarboxilase, enzima responsável por formar radicais nitrila altamente genotóxicos (YAMANE et al., 1995).

A espinheira-santa apresenta também atividades analgésicas e anti-inflamatórias (NAKAMURA et al., 1994; SHIMIZU e TOMOO, 1994; GONZALES et al., 2001) e hipotensiva óxido nítrico dependente (RATTMANN et al., 2006; CRESTANI et al., 2009).

Além do efeito sobre *H. pylori* comentado anteriormente, existem outras propriedades antimicrobianas descritas para a *M. ilicifolia* (LIMA et al., 1971).

1.4 ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS

As plantas possuem propriedades antimicrobianas, através de substâncias e óleos essenciais que são produtos de seu metabolismo secundário, e têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, sendo atualmente mais estudadas cientificamente. No Brasil, apesar da rica biodiversidade, somente estão disponíveis dados sobre 44 espécies de plantas pertencentes a 20 famílias, com atividade positiva, incluindo espécies nativas e exóticas. Os extratos, frações e compostos isolados apresentaram capacidade de controlar o crescimento de uma ou mais espécies de microrganismos, mostrando bom potencial de aplicação como antimicrobiano (DUARTE, 2006).

Muitas plantas ricas em polifenóis são utilizadas por várias culturas na medicina tradicional para tratar doenças infecciosas (CUSHNIE e LAMB, 2005). Os polifenóis são conhecidos por terem papel protetor contra invasão microbiana nas plantas que sintetizam esses compostos. Esse papel pode envolver substâncias constitutivas da planta ou produzidas como fitoalexinas em resposta a ataque microbiano (HARBORNE e WILLIAMS, 1992).

A *M. ilicifolia* apresenta vários grupos de compostos fenólicos como flavonóides, ácidos fenólicos e taninos, além de alcalóides, macrólideos e terpenóides, substâncias com potenciais terapêuticos bastante conhecidos (COIMBRA e DA SILVA, 1958; SIMÕES, 1986; ALONSO, 1998; CARLINI e FROCHTENGARTEN, 1998; ESTEVAM, 2009).

Alguns estudos sobre a *Maytenus ilicifolia* mostraram atividade antimicrobianas. As substâncias maitenina e pristimerina isoladas da raiz da espinheira possuem atividade contra bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp. (LIMA et al., 1971), e também contra fungos, como *Candida* e *Cryptococcus* spp. (GULLO et al.; 2012). Cunico et al. (2002) demonstra atividade inibitória desses mesmos compostos no crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* e *Cylindrocladium spathulatum*, fungos fitopatogênicos. O friedelanol e a friedelina possuem atividade contra *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Aspergillus niger* (SINGH & DUBEY, 2001).

Diversas patologias que afetam a saúde pública são de origem microbiana, nas últimas décadas, ganharam um destaque preocupante, devido não só à medidas inadequadas no controle de disseminação, mas principalmente com a evolução da resistência a antibióticos,

que acaba limitando as opções terapêuticas dos processos infecciosos (RAPP, 2004; WHO, 2015).

A resistência antimicrobiana ocorre quando microrganismos como bactérias, vírus, fungos ou parasitas mudam de uma maneira que torna o medicamento, até então usado, ineficaz. Isso se deve porque os microrganismos possuem alguma variação genética que resulta na capacidade de sobreviver quando expostos a esse antibiótico (WHO, 2015). Essas variações podem se dar de forma inata ou intrínseca, ocorrendo devido a mutações, assim como podem ser de forma adquirida, através de recombinação genética nos processos de conjugação (TRAVASSOS & MIRANDA, 2010).

Outro aspecto relevante na resistência a antibióticos é a formação de biofilmes, que são caracteristicamente compostos por populações microbianas genética e fenotipicamente diversas, e por isso apresentando diferentes graus de resistência, e que se aderem a superfícies, podendo colonizar desde tecidos, a cateteres e próteses implantadas cirurgicamente (KHODAVANDI, 2011). Dessa forma, estudos com plantas medicinais podem colaborar com a busca de alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças infecciosas.

Até o presente momento não foram encontradas publicações com extratos etanólicos das folhas e atividade antimicrobiana e resistência, apenas com compostos isolados da espinheira-santa (*M. ilicifolia*). Por isso justifica-se esse estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar fitoquimicamente extratos de folhas frescas e secas de *Maytenus ilicifolia* (Mart. ex Reissek) e avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

. Caracterizar os extratos etanólicos de folhas frescas e folhas secas de espinheira-santa, fitoquimicamente, através da quantificação por HPLC e análise de compostos fenólicos e flavonóides;

. Avaliar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos de folhas frescas e folhas secas de *M. ilicifolia* e a potencial modulação no mecanismo oxidativo bacteriano;

. Investigar a atividade antibacteriana dos extratos etanólicos de folhas frescas e folhas secas da espinheira-santa através da determinação da zona de inibição, da concentração inibitória mínima e da curva bacteriana utilizando a técnica de detecção de fragmentos de dsDNA com o corante Picogreen;

3 METODOLOGIA E RESULTADOS

A metodologia e os resultados obtidos serão apresentados nesta dissertação na forma de um manuscrito submetido à revista Fitoterapia (The Journal for the Study of Medicinal Plants) - ISSN: 1971-551X.

3.1 MANUSCRITO

**PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND EVALUATION OF
ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF *Maytenus*
ilicifolia (MART. ex REISSEK)**

Raul Moreira Oliveira^{1,6}, Micheli Lambert Jobim^{2,6}, Roberto Christ Vianna Santos³, Márcia Ebling de Souza³, Maria Fernanda Manica-Cattani^{1,6}, Aline Augusti Boligon⁴, Grazielle Castagna Cezimbra Weis^{5,6}, Beatriz da Silva Rosa Bonadiman^{2,6}, Audrei de Oliveira Alves^{2,6}, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,2,6}

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

³ Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Centro Universitário Franciscano, Brazil

⁴ Laboratório de Pesquisa Fitoquímica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

⁵ Programa de Pós-Graduação de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

⁶ Laboratório de Biogenômica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

Correspondig author: raul.moreira.oliveira@gmail.com;

Abstract

Despite the World Health Organization recognize the relevance of medicinal plants use by population to treat some health conditions, in some plant species, leaves are prepared from different forms without any criteria and previous efficacy and safety evaluation of each infusions preparation. This is the case of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (Celastraceae), popularly known as Espinheira-Santa. Popularly, this specie is used as infusion prepared from fresh or dried leaves. Therefore, the aim of this study was to evaluate the existence of potential differences of *M. ilicifolia* fresh and dried leaves extracts on bioactive molecules composition, antioxidant capacity and antimicrobial effect against 12 bacteria strains. Moreover, the effect of *M. ilicifolia* extracts on reactive oxidative species (ROS) modulation of bacteria were also investigated. Hydroalcoholic extracts using fresh and dried *M. ilicifolia* leaves were obtained and the quantification of eight bioactive molecules was performed by HPLC-DAD protocols. Antioxidant capacity and antibacterial effect were also evaluated. The *M. ilicifolia* extract produced from dried leaves presented higher concentration of bioactive compounds (mainly quercetin and caffeic acid), as well as a more efficient antibacterial activity despite the antioxidant capacity to be higher in fresh leaves extract. Both extracts at different concentrations decreased ROS levels. As concomitant antibacterial and antioxidant activities were observed in *M. ilicifolia* extracts, the results suggest that decreasing of ROS levels could cause cytotoxicity by reductive stress or to act as inhibitory signaling of bacteria proliferation. Complementary studies need to be perform to corroborate this hypothesis. The results presented here could be relevant, since show important impact of leaves preparation on extraction of some chemical compounds and the biological activities of *M. ilicifolia*.

1. Introduction

Approximately 80% world population uses phytotherapeutics and medicinal plants to treat clinical conditions, since a large number of people have low access to allopathic drugs [1]. For this reason, in Brazil primary health care uses medicinal plants following recommendations from World Health Organization [2]. A review performed by Antonio and colleagues [3] have compiled Brazilian objectives and actions of programs and showed that combined used of phytotherapy with other treatments can reduce costs, to preserve traditional knowledge and biodiversity, promoting social development and stimulating inter-sectorial actions.

However, several open questions related with popular use of medicinal plants need to be clarify in order to increase the clinical efficacy and decrease potential safe concerns. The plant preparation used in the decoctions/infusions can potentially changes the matrix of bioactive compounds and affect its biological properties. For example, *Camelia sinensis*, a Chinese plant is broadly consumed in the world as green, white and black tea according previous leaves post-harvest treatments, which affect the chemical composition of the tea infusion and potentially its effects on human health [4].

These differences related with post-harvest leaves treatment can be particularly important when the medicinal plant is used to treat acute diseases or symptoms, such as microbial infections. In infections, conditions a fast and efficient result is mandatory use, and delay or subclinical response to phythoterapics can be dangerous. Moreover, in Brazil there are several medicinal plants, which are indiscriminately used by population with various leaves post-harvest treatments without any criteria. For example, in Brazilian Southern Region, the leaves of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (Celastraceae) popularly known as Espinheira-Santa, are fresh or dried used in infusions [5].

Ethnopharmacological records describe that native Mbyá-Guarani tribes from South Brazil, used *M. ilicifolia* mainly as antitumor. Posteriorly this plant was incorporated in the pharmacopeia of settlers to treat other conditions including gastrointestinal disorders [5].

The *M. ilicifolia*, which is included in the Brazilian Pharmacopeia [6] presents a large number of bioactive molecules including several phenolic compounds such as flavonoids, phenolic tannins as well as alkaloids, terpenoids and other substances with potential therapeutic role [7,8,9,10,11]. Scientific evidence described and corroborate various biological activities of *M. ilicifolia* including antibiotic, antibiofilm, antiprotozoal, antiulcerogenic, anti-inflammatory and analgesic activities [12,13,14]. Apoptosis induction of HT-29 colorectal carcinoma cells of *M. ilicifolia* extracts, without cytotoxic effect on healthy cells was also reported in the literature [15].

Therefore, the present study quantified and compared chemical compounds and the antioxidant and antibacterial activities of *M. ilicifolia* extracts obtained from fresh and dried leaves.

2. Experimental

2.1 Plant Material

Samples of *M. ilicifolia* were collected in the urban zone of São Sepé City (Rio Grande do Sul State) located in Southern Brazilian Region ($30^{\circ}09'41.3"S$ $53^{\circ}34'05.5"W$). A botanist specialist identified the specimen, and a sample of the material was annexed as a voucher specimen (number HDCF 6749) at the Herbarium of Forest Sciences Department of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brazil. Part of samples were transferred to Biogenomic Lab (UFSM) and immediately were used to produce a hydro alcoholic extracts [16]. To obtain *M. ilicifolia* dried leaves, the samples were cleaned and dried for six days at room temperature and then air-dried in stove at $45^{\circ}C$ for 48h [16].

2.2 Leaves extracts preparation

Aerial parts (leaves) of *M. ilicifolia* were used to prepare two types of ethanolic extracts from fresh and dried leaves. Both ethanolic extracts were prepared the same way: leaves were macerated in ethanol 95% (EtOH) (100 g/1 L) and maintained at room temperature during four days under eventual agitation. Further, extracts were filtered and vacuum evaporated to dryness and the crude extracts were obtained (3.6 g for fresh and 3.7 g for dried leaves) and used to perform chemical and biological analysis. The extracts were stored at -20 C° until use.

2.3 Chemicals

All chemicals used in the protocols of this study were of analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, Germany) or Invitrogen (USA), unless otherwise stated.

2.4 HPLC-DAD and quantification parameters

Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20 A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software was used. For analysis of the extracts, 40 µL was injected at concentration of 15 mg/mL into a Phenomenex C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles. The mobile phase was consisted of solvent A (methanol: water; 9:1, v/v) adjusted to pH 3.5 with phosphoric acid and solvent B (acetonitrile: water: methanol; 60:20:20, v/v/v). At a flow rate of 0.6 mL/min, the following linear gradient was used: 0 min, 100% A; 10 min 30% A; 20 min, 40% A; 60 min, 0 % A; held at 0% A for 15 min. Five minutes of equilibration at 100% A was allowed before and after each injection [17]. All solvents and samples were filtered

through a 0.45 µm Millipore filter and then degassed by ultrasonic bath prior to use. The wavelengths used were 254 nm for gallic acid; 280 for catechin and epicatechin; 327 for caffeic acid; and 366 nm for rutin, quercitrin, quercetin and kaempferol. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.030 – 0.500 mg/mL. Chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 600 nm). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. Calibration curve for catechin: $Y = 12579x + 1183.7$ ($r = 0.9998$); gallic acid: $Y = 13058x + 1195.4$ ($r = 0.9997$); caffeic acid: $Y = 11935x + 1250.9$ ($r = 0.9995$); epicatechin: $Y = 12461x + 1376.3$ ($r = 0.9999$); rutin: $Y = 13285x + 1276.4$ ($r = 0.9997$); quercetin: $Y = 11953x + 1178.5$ ($r = 0.9996$); quercitrin: $Y = 12549x + 1308.9$ ($r = 0.9998$) and kaempferol: $Y = 13479x + 1235.7$ ($r = 0.9999$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves, as defined by Silva and colleagues [18]. LOD and LOQ were calculated as 3.3 and $10 \sigma/S$, respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

2.5 Spectrophotometric quantification

Total flavonoid and phenolic content (TPC) were quantified by spectrophotometric protocols. The total flavonoid content of the ethanolic extracts was determined photometrically using the aluminum chloride (AlCl_3) assay [19]. Briefly, a 0.1 mL aliquot of each extract (2.5 mg/mL) or standard solution of catechin (0 – 200 mg/mL) was added to an Eppendorf. Then, 0.05 mL of 5 % (v/v) aluminum chloride (AlCl_3) was added and after 0.85 mL of methanol was added. The solutions were homogenized and incubated for 30 minutes at room temperature.

After the samples were moved to a 96 well plate and the absorbance was measured against a prepared reagent blank in triplicate at 425 nm. The total flavonoid content was expressed as catechin equivalents in mg/100g of dry extract weight.

The TPC of the ethanolic extracts was determined using the Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) as previously described by Kim and colleagues [20], with slight modifications. Briefly, a 0.05 mL of each extract (2.5 mg/mL) or standard solution of gallic acid (0 – 0.6 mg/mL) was mixed with 0.05 mL of Folin-Ciocalteu reagent (1:1 v/v) followed by 0.1 mL of 35 % sodium bicarbonate (Na_2CO_3) and 0.8 mL of distilled water. Then, the mixture was incubated for 25 min at room temperature and after centrifuged for 10 minutes in 3000 RPM. The absorbance was measured at 725 nm in triplicate. The total phenolic were quantified using a calibration curve constructed from measurements of the standard gallic acid concentrations and expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per mg of dry extract weight.

2.6 Antioxidant capacity assay

The antioxidant capacity of the extracts was quantified by determining the radical scavenging ability, using the stable radical, DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) as reported previously [21,22,23]. An aliquot (0.01 mL) of 0.2 mM DPPH solution in methanol and 0.01mL of each extract at increasing concentrations (10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 and 500 $\mu\text{g/mL}$) were mixed vigorously together and left at room temperature in the dark. The absorbance was measured at 517 nm after 30 min against different concentrations of the extracts in methanol as blanks and DPPH in methanol without extract as the control. The rutin solution was used as the positive control.

2.7 Antibacterial protocols

All assays related to determination of antibacterial activity of *M. ilicifolia* fresh and dried extracts were performed in triplicate and the results were presented as percent (%) of untreated microorganism cultures (negative control).

2.7.1 Microorganisms

The antimicrobial activity of *M. ilicifolia* was tested against microbial strains obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and clinical and environmental isolates provided by Microbiology Department from Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), stored in nutrient agar slants at 4°C. Were tested four Gram-positive bacteria: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus* sp. (clinical isolate), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA (clinical isolate) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 00039); and eight Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Shigella flexneri* (ATCC 12022323A), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1705), and *Pseudomonas aeruginosa* (PA01).

2.7.2 Inoculums preparations

The preparation of inoculums was standardized according to the Clinical Laboratory Standards Institute guidelines [24]. Isolated colonies grew up in Brain Heart Infusion (BHI) agar plates for 18 to 24 h were suspended in saline and adjusted to match a 0.5 McFarland turbidity standard in spectrophotometric length of 600 nm, which corresponds to 1.5×10^8 colony-forming units (CFU)/mL.

2.7.3 Determination of inhibition zone diameter (IZD)

The evaluation of the extracts activities was done by utilizing the disk diffusion method on plates with Muller-Hinton Agar (MHA, Hi-media, Mumbai, India), with the determination of the inhibition zone diameters in millimeter (mm) [24]. Each plate with MHA had its surface completely inoculated using sterile swabs steeped in saline suspensions with microorganisms and then were placed sterile paper discs (6mm) impregnated with 20 µL of the extract on the plates and incubated for 24h at 37 °C. After incubation, the diameter of the growth inhibition zones was measured.

2.7.4 Determination of minimal inhibitory concentration (MIC)

The microorganisms whose extracts showed inhibitions in the disk diffusion were tested to MIC determination by microdilution technique in 96 wells microtiter plates [24] with Mueller-Hinton Broth (Difco) and different concentrations of extracts. After 24h incubation at 37 °C, MIC was defined as the lowest concentration able to inhibit growth, utilizing 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as an indicator.

2.7.5 Cell-free DNA supernatant assay to evaluated *M. ilicifolia* fresh and dried extracts cytotoxicity

The potential cytotoxic effect of *M. ilicifolia* fresh and dried extracts against microorganisms was evaluated using quantification of double-strand DNA fragments present in the supernatant cultures as a method previously validated by Jobim and colleagues [25]. The assay used Picogreen dye DNA ligand using fluorescence microplates 96-well and Quanti TTM

PicoGreen ® kit (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The 24 h bacterial cultures (5×10^5 CFU/ml) without any additional treatment (negative control) and exposed to *M. ilicifolia* extracts were centrifuged (x 2500 g) during 10 minutes and 10 µL supernatant samples were collected and transferred to 96-microplates and PicoGreen ® dye diluted 1:200 with TE buffer was added in each well. The microplate was in the dark at room temperature for 5 min. To minimize photobleaching effects, time for fluorescence measurement was kept constant for all samples. Fluorescence emissions were recorded at 528 nm and excitation wavelength of 485 nm at room temperature (25°C) using a fluorimeter Spectra Max M2/M2e Multi-mode Plate Reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA. The cytotoxic was evaluated when dsDNA levels increased when compared to untreated control group indicating cell dead and DNA fragmentation. The results were expressed as % of untreated control group.

2.7.6 Reactive Oxygen Species (ROS) assay

Since, *M. ilicifolia* extracts have potential antioxidant activity that could causes cytotoxic effect on bacteria due Redox imbalance, the ROS levels were measured 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. The DCFH-DA is degraded by intracellular esters to DCFH, which then can be oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by oxidizing agents in the cell. To evaluate ROS levels, the microorganisms cultures with and without *M. ilicifolia* extracts exposure were treated with DCFH-DA (10 µ) for 1 h at 37 °C. Further, the fluorescence was measured at 488 nm of excitation and 525 nm of emission.

2.8 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (Version 6.0), The results obtained are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni *post hoc* test was applied to compare differences between two extracts at different concentrations. Tests with $p < 0.05$ value were considered statistically significant.

3. Results and Discussion

Phenolic compound concentrations was significantly lower in the dried extract (4.861 ± 0.78 mg gallic acid E/g dw) than fresh *M. ilicifolia* extract (8.096 ± 1.23 mg GAE/g dw) ($p \leq 0.001$). However the concentration of total flavonoids was similar between extracts (dried extract = 4.371 ± 0.78 ; fresh extract= 4.159 ± 0.88 mg catechin/g dw).

Chromatogram analysis showed eight main bioactive compounds to *M. ilicifolia* extracts as can see in Figure 2. The HPLC fingerprinting of extracts revealed the presence of gallic acid (Retention time - $tR = 10.54$ min; peak 1), catechin ($tR = 14.97$ min; peak 2), caffeic acid ($tR = 24.73$ min; peak 3), epicatechin ($tR = 31.09$ min; peak 4), rutin ($tR = 36.14$ min; peak 5), quercitrin ($tR = 43.85$ min; peak 6), quercetin ($tR = 45.11$ min; peak 7) and kaempferol ($tR = 57.63$ min; peak 8).

Compounds concentrations were significantly different between extracts (Table 1). Dry leaves extract presented higher concentration of gallic acid, catechin, caffeic acid, rutin and quercetin whereas fresh leaves presented higher concentration of quercitrin and kaempferol. Epicatechin was also quantified but just detected in dry leaves.

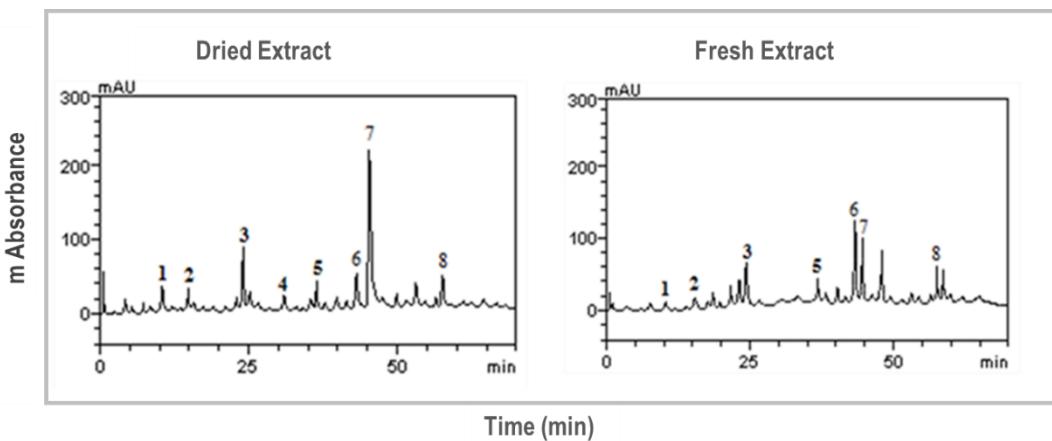


Figure 1 – Representative high performance liquid chromatography profile of Espinheira-Santa. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), caffeic acid (peak 3), epicatechin (peak 4), rutin (peak 5), quercitrin (peak 6), quercetin (peak 7) and kaempferol (peak 8).

Table 1 – Bioactive compounds of *M. ilicifolia* extracts measured by HPLC-DAD

Compounds	<i>Espinheira-Santa</i>		LOD	LOQ
	Dry leaves (mg/g)	Fresh leaves (mg/g)		
Gallic acid	0.59 ± 0.03	0.32 ± 0.01 ***	0.015	0.049
Catechin	0.61 ± 0.01	0.47 ± 0.01***	0.027	0.090
Caffeic acid	1.83 ± 0.01	1.52 ± 0.02 **	0.009	0.031
Epicatechin	0.47 ± 0.04	-	0.011	0.036
Rutin	0.87 ± 0.02	0.61 ± 0.01**	0.023	0.075
Quercitrin	0.92 ± 0.01	3.04 ± 0.03***	0.016	0.053
Quercetin	5.03 ± 0.01	2.78 ± 0.03***	0.024	0.080
Kaempferol	0.91 ± 0.02	1.49 ± 0.01***	0.008	0.025

Results are expressed as mean ± standard deviations (SD) of three determinations. Averages were compared by Two-way analysis of variance followed by Bonferroni post hoc test. ** p=0.01; *** p < 0.001.
LOD = limit of detection; LOQ= limit of quantification.

The compound with higher concentration in dried extract was quercetin followed by caffeic acid, and in the fresh extract was quercitrin followed by quercetin. Despite to observed differences in compounds concentrations, both extracts presented important bioactive

molecules, such as phenolics, condensed and hydrolysable tannins that have positively effect on human health [26,27].

The antioxidant capacity was evaluated and compared between extracts using rutin antioxidant control (Figure 2). The results showed high and similar antioxidant capacity of fresh extract and rutin. Despite to *M. ilicifolia* dried extract have higher concentrations of main bioactive compounds its antioxidant capacity was lower than fresh extract and rutin. Previous investigations also described antioxidant capacity of *M. ilicifolia*. However, the two main studies were performed using root extracts [28,29] becomes difficult to perform comparisons. The lower antioxidant capacity in dried leaves could be considered surprisingly, since dried extract presents with higher concentration of important and recognized antioxidant molecules [26,27]. A possible explanation of these results is the fact that drying processes can concentrate healthy and toxic molecules, and the interaction between these could to be influencing the final antioxidant capacity of the extract.

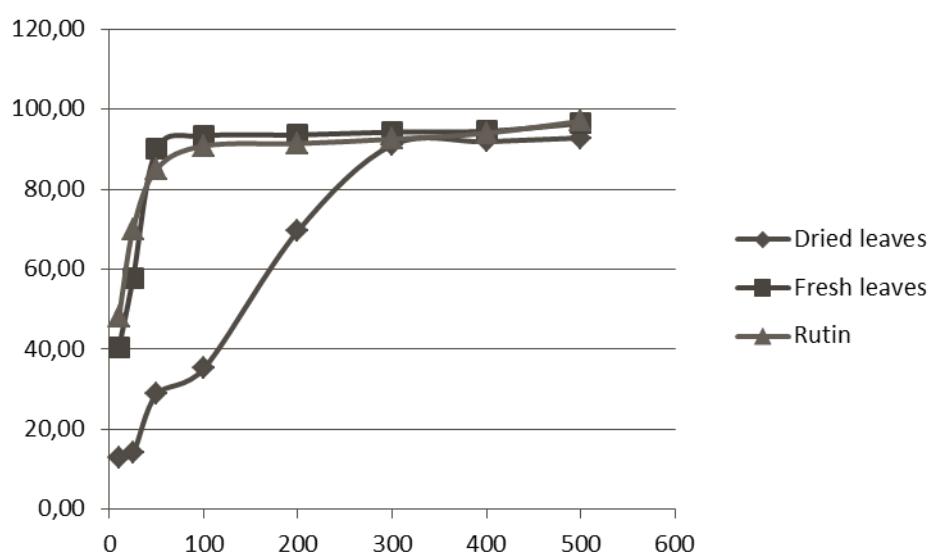


Figure 2 Comparison of antioxidant capacity determined by DPPH assay between dried and fresh leaves of *M. ilicifolia* using rutin as control antioxidant molecule.

Antimicrobial activity of *M. ilicifolia* extracts was also tested against 12 microorganisms (Table 2). Dried extract present activity against all microorganisms tested here. At contrary, fresh extract did not present inhibition growing of *Enterococcus faecalis*, and *Staphylococcus aureus*. The *Salmonella enteritidis* and *Klebsiella pneumoniae* were the microorganisms more susceptible to both *M. ilicifolia* extracts. However, dried extract presented stronger growing inhibition in these bacteria than fresh extract.

The Kill-kinetics curves were determined for *Salmonella enteritidis* and *Klebsiella pneumoniae* that were the two more susceptible bacteria for two *M. ilicifolia* extracts. These curve were evaluated by dsDNA level in supernatant cultures measured by Picogreen dye. The kinetic curve was performed using four concentrations based in MIC: $0.25 \times \text{MIC}$, $0.50 \times \text{MIC}$, MIC , $2 \times \text{MIC}$ and $4 \times \text{MIC}$. Both *M. ilicifolia* extracts caused more cytotoxicity to *Salmonella enteritidis* in higher concentration tested here (325.58 mg/mL). However, the best concentration of dried extract to kill *Klebsiella pneumoniae* was 81.63 mg/mL.

Table 2 – Antimicrobial activity of *M. ilicifolia* dried and fresh leaves extracts against Gram-(+) and Gram(-) bacteria through agar diffusion and microdilution.

Tested microorganisms	IZD (mm)		MIC (mg/mL)	
	Dried	Fresh	Dried	Fresh
Gram-positive				
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	8.03 ± 0.42	-	125	-
<i>Streptococcus</i> sp.	7.65 ± 0.65	6.79 ± 0.22	50	125
MRSA	7.55 ± 0.72	8.11 ± 0.28	75	150
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 00039	6.59 ± 0.47	-	-	-
Gram-negative				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	7.17 ± 0.34	8.74 ± 0.44	75	150
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8.89 ± 0.54	8.11 ± 0.65	50	100
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022323A	8.02 ± 0.67	7.91 ± 0.39	50	150
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	7.26 ± 0.31	6.97 ± 0.55	75	150
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	7.61 ± 0.39	8.16 ± 0.32	75	150
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	7.82 ± 0.65	8.75 ± 0.89	25	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 1705	7.07 ± 0.45	6.24 ± 0.18	25	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	6.66 ± 0.21	6.53 ± 0.13	100	125

IZD = inhibitory zone diameter; MIC = minimal inhibitory concentration; (-) = no activity observed

The results presented here showed that both *M. ilicifolia* extracts presented antimicrobial activity against *Salmonella enteritidis* and *Klebsiella pneumoniae*. However, this activity was strongly influenced by leaves preparation against *Klebsiella pneumoniae*. Independent of this fact it is important to comment that, for our best knowledge this is the first study that described antimicrobial properties of *M. ilicifolia* leaves extract against these bacteria.

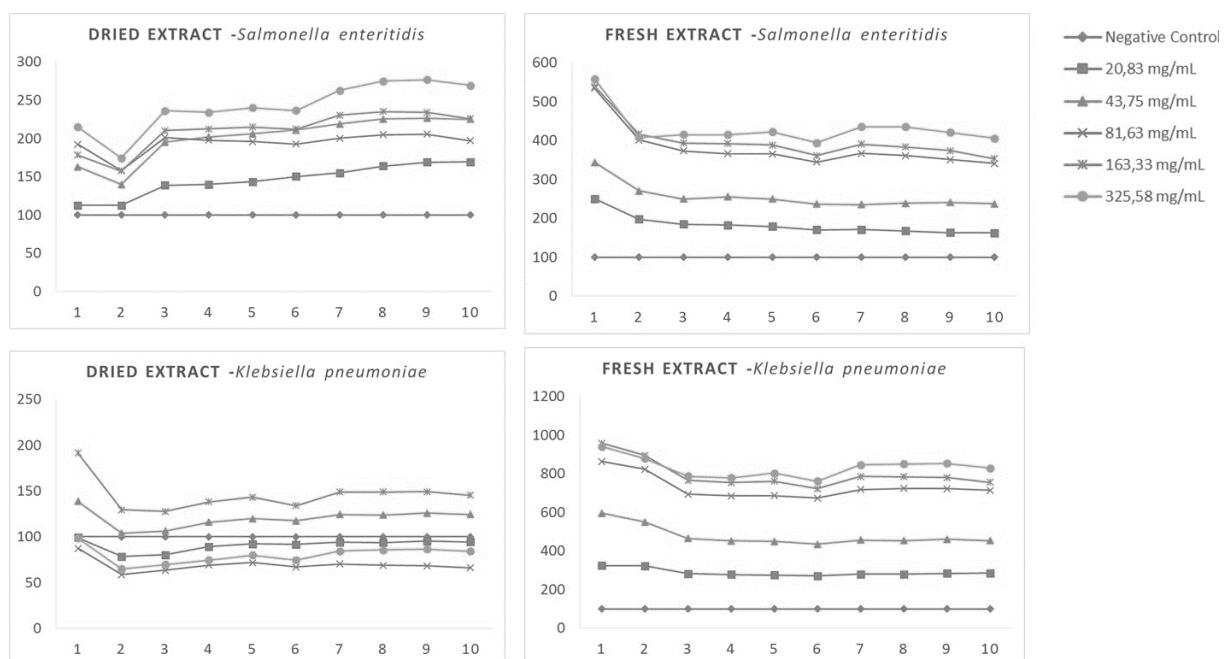


Figure 3 - Kill-kinetics curves for *Salmonella enteritidis* and *Klebsiella pneumoniae* exposed to dried and fresh *M. ilicifolia* extracts. These curves were evaluated by dsDNA level in supernatant cultures measured by Picogreen dye.

Other consideration is respect to dsDNA analysis used here to determine kill-curves using DNA Picogreen dye. Generally, kill-curves of bacteria are measured by optical density (OD) analysis. However, this protocol can read cellular debris, other supernatant components and interspecific molecules that can interfere in data collection and results interpretation. For

this reason, Jobim and colleagues [25] validated the use of dsDNA supernatant levels to estimated cytotoxicity of plant extracts in microorganisms. These authors developed the dsDNA protocol from a fluorimetric assay adapted of previous studies performed by Batel and colleagues [30] and Georgiouet and colleagues [31] to eukaryotic cells. The assessment of fluorescence changes of the Picogreen dye DNA ligand is also used to high-throughput screening assay for the discovery of nuclease inhibitors in *Streptococcus pneumoniae* [32]. The PicoGreen assay used in the present investigation was considered satisfactory, because this dye is an ultra-sensitive molecule for quantitating dsDNA fragments. As dsDNA are found just into living cells, the increase of fluorescence on supernatant samples indicate elevation of these molecules, and consequently cell mortality.

Since the both extracts are rich in antioxidant molecules, their effects on bacteria could to involve some level of Redox imbalance. To test this hypothesis the ROS levels were measured in the 12 bacteria exposed to *M. ilicifolia* extracts at different concentrations. The results presented in Figure 4 showed that all bacteria, treated with *M. ilicifolia* extracts decreased ROS levels. However, the extracts action presented some variations according to bacteria, concentrations and type of leaves extracts. Interesting, despite the efficacy of antimicrobial activity to be influenced by type of *M. ilicifolia* extracts, in general the effect on ROS levels was very similar in both extracts.

These results suggest the existence of an interactive antioxidant/antibacterial effect of plants that act on microorganisms. However, each microorganism, probably have some specific biochemical adaptations that become each one more or less susceptible to several types of plant extracts and their various forms of preparation. To discuss these hypothesis is important to do some theoretical considerations.

At principle, living organisms evolved to have antioxidant machinery to protection against oxidative and nitrosative stress caused mainly by environmental factors. Probably, for

this reason a large number of bacteria produce some antioxidant enzymes, such as catalase [33].

As body tissues invaded by a bacteria has high levels of ROS and RNS produced mainly by cells of innate immune system produces in order to kill this microorganisms, the use of antioxidant molecules could be an adaptive strategy to avoid bacteria dead. However, antioxidants seem to cause extensive mortality and reduction on proliferation rates of microorganisms, as observed by previous investigations and from results described here.

In these terms, the bacteria protection against oxidative stress in the host tissue probably involves other cellular pathways. To test this hypothesis, van der Heijden and colleagues [34] performed an innovative and recent study that used a system coupled with high-throughput microscopy, to evaluate the intrabacterial redox dynamics of *Salmonella enterica* residing inside macrophages. The authors observed that bacterial SPI-2 type III secretion system was required for ROS evasion strategies, and this evasion relies on an intact *Salmonella*-containing vacuole (SCV) within which the bacteria reside during infection. Therefore, these results highlight the existence of specialized evasion strategies used by intracellular pathogens.

Therefore, several bacterial pathogens such as *Salmonella* have evolved their invasive mechanisms to evade degradation when exposure to high levels of ROS and RNS produced by hosts [34].

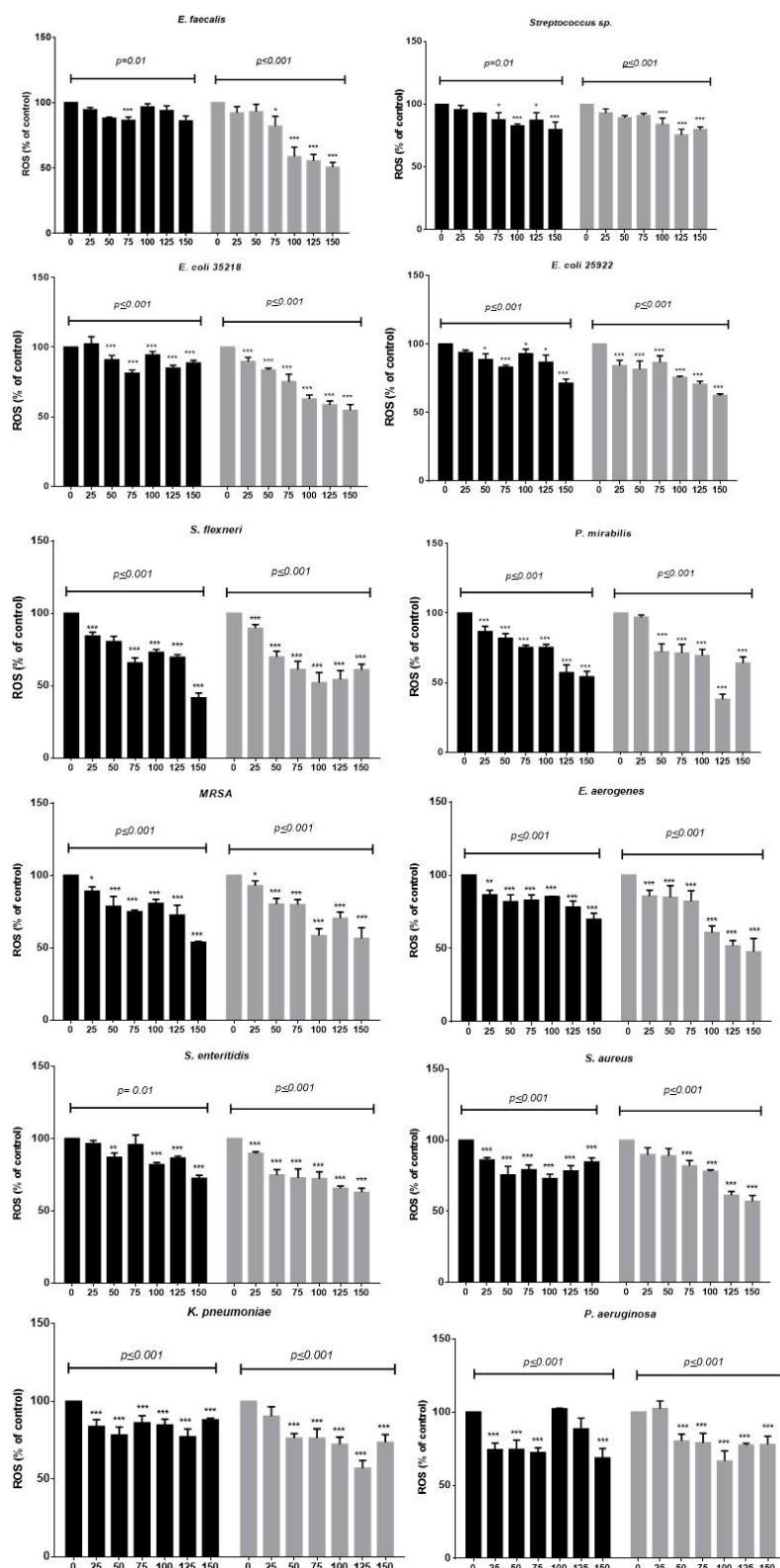


Figure 4 ROS levels of 12 bacteria treated at different concentrations of *M. ilicifolia* dried and fresh leaves extracts. The treatments were compared by two-way analysis of variance followed by Bonferroni post hoc test. However the significance at $p = 0.05$ (*), $p = 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) is presented just among treatments in relation to untreated control group.

Furthermore, it is plausible to think that, in a high oxidative microenvironment, the molecules such as hydrogen peroxide could also act on bacterial system as signaling improving the proliferative rates of these organisms, such as occur with some eukaryotic adult stem-cells [35]. On the other hand, abrupt increase in the concentration of antioxidant molecules could cause cytotoxicity by undetermined pathways and/or also act as signaling inhibitor of cell proliferation. These two ways could explain the role concomitant antioxidant and antimicrobial of some bioactive molecules present in medicinal plants.

4. Conclusions

The results described here suggested that antioxidant and antimicrobial efficacy of *M. ilicifolia* is directly influenced by leaves preparation, similar that occur with other exotic medicinal plants such as *Camelia sinensis*. The *M. ilicifolia* extract produced from dried leaves presented higher concentration of bioactive compounds, as well as a more efficient antibacterial activity despite the antioxidant capacity to be higher in fresh leaves extract. A concomitant antibacterial and antioxidant activity was observed in both extracts and these results suggest that decreasing of ROS levels could cause cytotoxicity by reductive stress or to act as inhibitory signaling of bacteria proliferation. However, complementary studies need to be performed to confirm this hypothesis. Despite the methodological limitations related with *in vitro* protocols, the results presented here could be considered clinically relevant, since medicinal plants have been broadly used in the world populations, in special *M. ilicifolia* that is included as medicinal plant prescribed by Brazilian primary health care.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work has financial supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

- ¹ Veiga Junior VF, Pinto, AC. Química Nova 2002;25:273.
- ² Alvim NAT, Ferreira MA, Cabral IE, Almeida AJ., Filho The use of medicinal plants as a therapeutical resource: from the influences of the professional formation to the ethical and legal implications of its applicability as an extension of nursing care practice. Rev Latino-Am Enfermagem. 2006;14(3):316–323.
- ³ Antonio GD, Tesser CD, Moretti-Pires RO. Phytotherapy in primary health care. Rev Saude Publica 2014;48(3):541-53.
- ⁴ Tenore GC, Daglia M, Ciampaglia R, Novellino E. Exploring the nutraceutical potential of polyphenols from black, green and white tea infusions - an overview. Curr Pharm Biotechnol 2015;16(3):265-71
- ⁵ Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. Rev Bras Farmacogn 2006;16:408-420.
- ⁶ Brasil “Farmacopéia Brasileira. 4 ed.2002.
- ⁷ Coimbra R, Da Silva ED. Notas de fitoterapia. Laboratório Clínico Silva Araújo, Rio de Janeiro, 1958;32-33.
- ⁸ Simões CMO, Mentz LA, Schenkel EP, Irgang BE, Stehmann JR. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. Editora UFRGS, Porto Alegre, 1986.
- ⁹ Alonso JR. Tratado de fitomedicina bases clínica y farmacológicas. Buenos Aires, Isis Ediciones SRL, 1998.
- ¹⁰ Carlini EA, Frochtengarten ML. Toxicologia clínica (Fase I) da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). Publicação CEME PPPM No. 2, Brasília- Distrito Federal, 1988.
- ¹¹ Estevam CS, Cavalcanti AM, Cambui EVF, Araújo Neto V, Leopoldo PTG, Fernandes RPM, Araujo BS, Porfirio Z, Sant'ana AEG. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rígida* Mart. (Celastraceae). Rev Bras Farmacogn 2009;19.
- ¹² Souza-Formigoni ML, Oliveira MG, Monteiro MG, da Silveira-Filho NG, Braz S, Carlini EA. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. J Ethnopharmacol. 199;34(1):21-7.
- ¹³ Queiroga CL, Silva GF, Dias PC, Possenti A, de Carvalho JE. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3beta-ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). J Ethnopharmacol. 2000 Oct;72(3):465-8.
- ¹⁴ Nakamura M, Kakasumi T, Minagawa Y, Yoshizawa T. *Maytenus ilicifolia* extracts, especially quercetin-3-O-glucoside, as analgesic and anti-inflammatory agents. Japan Kokai Tokkyo Koho 1994; 96:981.
- ¹⁵ Araújo Júnior RF, Oliveira AL, Pessoa JB, Garcia VB, Guerra GC, Soares LA, Souza TP, Petrovick PR, Araújo AA. *Maytenus ilicifolia* dry extract protects normal cells, induces apoptosis and regulates Bcl-2 in human cancer cells. Exp Biol Med (Maywood). 2013 Nov 1;238(11):1251-8.

¹⁶ Mendes BG, Machado MJ, Falkenberg M. Triagem de glicolipídios em plantas medicinais. Rev Bras Farmacogn, 2006.

¹⁷ Boligon AA, Pimentel VC, Bagatini MD, Athayde ML. Effect of *Scutia buxifolia* Reissek in nucleotidase activities and inhibition of platelet aggregation. Journal of Natural Medicine 2015;69: 46-54.

¹⁸ Silva ARH, Moreira LR, Brum ES, Freitas ML, Boligon AA, Athayde ML, Roman SS, Mazzanti CM., Brandão R. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. Journal of Ethnopharmacology 2014;53: 908-916.

¹⁹ Boroski M, Visentainer JV, Cottica SM, Morais DR. Antioxidantes: princípios e métodos analíticos. Curitiba: Editora Appris, 2015.

²⁰ Kim D-O, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chem. 81, 2003.

²¹ Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, Santos TC, Coube CS. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytother Res 2001;15(2):127-30.

²² Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, AHN HJ, Lee MY, Park SH, Kim SK. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. Plant Sci 2002;163:1161-1168.

²³ Zhang X, Xu JK, Wang J, Wang N-L, Kurihara H, Kitanaka S, Yao X-S. Bioactive Bibenzyl Derivatives and Fluorenones from *Dendrobium nobile*. Journal of Natural Products 2007; 70 (1):p 24-28.

²⁴ CLSI – M7-A6. Clinical Laboratory Standards Institute, 2009.

²⁵ Jobim ML, Santos RC, dos Santos Alves CF, Oliveira RM, Mostardeiro CP, Sagrillo MR, de Souza Filho OC, Garcia LF, Manica-Cattani MF, Ribeiro EE, da Cruz IB. Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. Microbiol Res. 2014 Apr;169(4):314-23.

²⁶ Kolekar V, Kubikova K, Rehakova Z, Kuca K, Jun D, Jahodar L, Opletal L. Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. Mini Rev Med Chem. 2008 May;8(5):436-47.

²⁷ Sroka Z. Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. Naturforsch C. 2005;60(11-12):833-43.

²⁸ Dos Santos VA, Dos Santos DP, Castro-Gamboa I, Zanoni MV, Furlan M. Evaluation of antioxidant capacity and synergistic associations of quinonemethide triterpenes and phenolic substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). Molecules. 2010 Oct 11;15(10):6956-73.

²⁹ Vellosa JC, Khalil NM, Formenton VA, Ximenes VF, Fonseca LM, Furlan M, Brunetti IL, Oliveira OM. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. Fitoterapia. 2006 Apr;77(3):243-4.

³⁰ Batel R, Jakšić Z, Bihari N, Hamer B, Fafandel M, Chauvin C, Schröder HC, Müller WE, Zahn RK. A microplate assay for DNA damage determination (fast micromethod). Anal Biochem, 1999; 1;270(2):195-200.

³¹ Georgiou CD, Papapostolou I, Grintzalis K. Protocol for the quantitative assessment of DNA concentration and damage (fragmentation and nicks). Nat Protoc, 2009; 4(2):125-31.

³² Peterson EJ, Kireev D, Moon AF, Midon M, Janzen WP, Pingoud A, Pedersen LC, Singleton SF. Inhibitors of *Streptococcus pneumoniae* Surface Endonuclease EndA Discovered by High-Throughput Screening Using a PicoGreen Fluorescence Assay. J Biomol Screen, 2013; 18(3):247-57.

³³ Kulkarni SV, Markad VL, Melo JS, D'Souza SF, Kodam KM. Biodegradation of tributyl phosphate using *Klebsiella pneumoniae* sp. S3. Appl Microbiol Biotechnol 2014 Jan;98(2):919-29.

³⁴ Van der Heijden J, Bosman ES, Reynolds LA, Finlay BB. Direct measurement of oxidative and nitrosative stress dynamics in *Salmonella* inside macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jan 13;112(2):560-5.

³⁵ Zhang J, Chen GH, Wang YW, Zhao J, Duan HF, Liao LM, Zhang XZ, Chen YD, Chen H. Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction. Chin Med J (Engl). 2012 Oct;125(19):3472-8.

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram avaliados dois tipos de extrato etanólicos, produzidos com folhas frescas e outro com folhas secas de *M. ilicifolia*. Quando comparado entre si, podemos observar que há uma diferença significativa entre as concentrações dos compostos. O extrato de folhas secas apresentou maior concentração de ácido gálico, catequina, ácido cafeico, rutina e quercetina enquanto o extrato de folhas frescas apresentou alta concentração de quercitrina, kaempferol e epicatequina mas, também quantificadas nas folhas secas. Apesar das diferenças observadas nas concentrações dos compostos, ambos os extratos apresentaram importantes moléculas bioativas como os fenóis, taninos condensados e hidrolisados que possuem efeito positivo na saúde humana (KOLECKAR et al., 2008; SROKA, 2005).

A capacidade antioxidante foi avaliada e comparada entre os dois extratos usando a rutina como controle antioxidante. Os resultados mostraram alta e similar capacidade antioxidante do extrato de folha fresca e a rutina. Apesar de o extrato de folha seca de *M. ilicifolia* ter altas concentrações dos principais compostos bioativos a sua capacidade antioxidante foi mais baixa que o extrato de folhas frescas. Estudos anteriores também descreveram a capacidade antioxidante para a *M. ilicifolia*. No entanto os dois principais estudos sobre o assunto foram realizados com extratos de raiz da planta (DOS SANTOS et al., 2010; VELOSSA et al., 2006) o que torna difícil a comparação. A baixa capacidade antioxidante nos extratos de folhas secas pode ser considerada surpreendente, uma vez o extrato de folha seca apresenta altas concentrações de importantes compostos reconhecidos como moléculas antioxidantes (KOLECKAR et al., 2008; SROKA, 2005). Uma possível explicação para estes resultados é o fato de que o processo pode concentrar tanto as moléculas benéficas como moléculas tóxicas, e a interação delas pode estar influenciando a capacidade antioxidante final do extrato.

Os resultados aqui encontrados mostraram que o extrato feito com folhas secas de *M. ilicifolia* apresentou efeito antimicrobiano contra todos os 12 microrganismos testados, sendo *Salmonella enteritidis* e *Klebsiella pneumoniae* as bactérias mais suscetíveis a ambos os extratos. Entretanto o extrato folha fresca não apresentou inibição em *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. A intensidade deste efeito foi influenciada pela preparação das folhas, uma vez que o extrato de folhas secas apresentou uma inibição do crescimento mais forte que o extrato de folhas frescas em todas as bactérias testadas verificado através do MIC. Independente deste fato é importante comentar que, para o nosso entendimento, este é o

primeiro estudo que descreve as propriedades antimicrobianas do extrato de folhas de *M. ilicifolia*.

Uma outra consideração é a respeito da análise de DNA dupla fita (dsDNA) usada aqui para determinar a curva de mortalidade com o reagente corante DNA Picogreen. Geralmente as curvas de mortalidade são medidas por análise de densidade óptica (D.O). Porém, este protocolo pode ler células debris, outros componentes do sobrenadante e moléculas inespecíficas que podem interferir na coleta de dados e na interpretação. Por este motivo, Jobim e colaboradores (2014) validaram o uso dos níveis de dsDNA no sobrenadante para estimar a citotoxicidade de extrato de plantas em microrganismos. Estes autores desenvolveram o protocolo de dsDNA a partir do método fluorimétrico adaptado de estudos anteriores realizados por Batel e colaboradores (1999) e Georgiou e colaboradores (2009) para células eucarióticas. A avaliação das mudanças de fluorescência do Picogreen é também usada para ensaio de screening de alto rendimento para descobrir os inibidores de nuclease em *Streptococcus pneumoniae* (PETERSON et al., 2013). O ensaio do PicoGreen usado neste trabalho foi considerado satisfatório, porque o corante é uma molécula ultrassensível para quantificação de fragmentos de DNA dupla fita. Como o dsDNA é encontrado apenas dentro das células vivas, o aumento na fluorescência no sobrenadante das amostras indica elevação destas moléculas e consequentemente mortalidade celular.

Uma vez que ambos os extratos são ricos em moléculas antioxidantes, seus efeitos nas bactérias podem envolver um nível de desbalanço REDOX. O que observamos foi que todas as bactérias tratadas com os extratos de folha de *M. ilicifolia* tiveram os níveis de espécies de oxigênio (EROs) reduzidas. No entanto, os extratos apresentaram algumas variações de acordo com cada bactéria, concentração e tipo de folha do extrato. O interessante é que apesar da eficácia das atividades antimicrobianas estarem sendo influenciadas pelo tipo de extrato das folhas de *M. ilicifolia*, em geral o efeito nos níveis de EROs foi muito similar entre os dois extratos.

Os resultados sugerem a existência de um efeito interativo antioxidante-antibacteriano de plantas na ação contra os microrganismos. Entretanto, cada microrganismo provavelmente tenha alguma adaptação bioquímica específica que o torna mais ou menos suscetível à várias formas de preparação do extrato. Para discutir esta hipótese é importante fazer algumas considerações teóricas. A princípio, organismos vivos evoluíram para ter uma maquinaria antioxidante contra o estresse oxidativo e nitrosativo causado principalmente pelos fatores ambientais. Provavelmente por esta razão que um grande número de bactérias produzem enzimas antioxidantes, como a catalase (KULLKARNI et al., 2014). Os tecidos do corpo

invadidos pela bactéria tem alto nível de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERN) produzidos principalmente pelas células do sistema imune inato em ordem de matar estes microrganismos. O uso das moléculas antioxidantes (endógenas) pode ser uma estratégia adaptativa para evitar a morte da bactéria. Entretanto, os antioxidantes (exógenos) parecem causar uma extensiva mortalidade e redução nas taxas de proliferação dos microrganismos, como observados pelos estudos anteriores e os resultados descritos a partir daqui.

Nesses termos, a proteção da bactéria contra o estresse oxidativo no tecido do hospedeiro, provavelmente, envolve outras vias celulares. Para testar esta hipótese, van der Heijden e colaboradores (2015) realizaram um estudo recente e inovador que usa um sistema acoplado com microscópio de alta performance, para avaliar as dinâmicas redox intrabacterianas de *Salmonella enterica*, residindo dentro dos macrófagos. Os autores observaram que o sistema de secreção SPI-2 tipo III (relacionado a uma ilha de patogenicidade, fragmentos de DNA incorporados pela bactéria) possui papel importante nas estratégias de evasão a EROs, e esta evasão resulta de vacúolos contendo *Salmonella* (*Salmonella*-containing vacuole - SCV) dentro dos quais as bactérias residem durante a infecção. Portanto, estes resultados ressaltam a existência de estratégias especializadas usadas por microrganismos patogênicos.

Assim, muitas bactérias patogênicas, como a *Salmonella*, têm evoluído para mecanismos invasivos para evitar a degradação quando a exposição a altos níveis de EROs e ERNs produzidos pelos hospedeiros (VAN DER HEIJND, 2015).

Além disso, é plausível pensar que, em um microambiente altamente oxidativo as moléculas como peróxido de hidrogênio possam também agirem sobre o sistema bacteriano como promotor da sinalização das taxas proliferativas destes organismos, como ocorre com algumas células tronco eucarióticas adultas (ZHANG et al., 2012). Por outro lado, um aumento abrupto das concentrações das moléculas antioxidantes pode causar uma citocixide por vias indeterminadas e/ou também agir como inibidores de sinalização da proliferação celular. Estas duas vias podem explicar o papel concomitante antioxidant e antibacteriano de algumas moléculas bioativas presentes nas plantas medicinais.

5 CONCLUSÃO

Os resultados descritos aqui sugerem que a atividade antioxidante e antimicrobiana de *M. ilicifolia* está diretamente influenciada pela preparação das folhas, similar ao que ocorre

com outras plantas medicinais exóticas como a *Camelia sinensis*. O extrato de *M. ilicifolia* produzido a partir de folhas secas apresentou uma maior concentração de compostos bioativos, bem como uma atividade antibacteriana maior apesar da capacidade antioxidante ser maior no extrato de folhas frescas. A atividade concomitante antibacteriana e antioxidante foi observada nos dois extratos e estes resultados sugerem que o decréscimo dos níveis de EROs podem ser causados por citotoxicidade pelo estresse redutivo ou por ação da sinalização inibitória para proliferação da bactéria. Entretanto, estudos complementares precisam ser realizados para confirmar esta hipótese. Apesar das limitações metodológicas relacionadas com os protocolos *in vitro*, os resultados aqui apresentados podem ser considerados relevantes, uma vez que plantas medicinais têm sido amplamente usadas pela população mundial, em especial a *M. ilicifolia* que está incluída como planta medicinal prescrita pelo sistema de saúde básico Brasileiro.

6 BIBLIOGRAFIA

- AKELERE, O. **Importance of Medicinal Plants**: WHO'S Programme in Natural resources and Human Health. Elsevier Amsterdam-London-New York-Tokyo, 1992.
- ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina bases clínica y farmacológicas**. Buenos Aires, Isis Ediciones SRL, 1998.
- ALZUGARAY, D. & ALZUGARAY, C. **Plantas que curam**. São Paulo: Três Ltda., v.1, 1996.
- ANNUK, H.; HIRMO, S.; TÜRI, E.; MIKELSAAR, M.; ARAK, E.; WADSTROM, T. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. **FEMS Microbiol Lett** 172: 41-45. 1999.
- ATTISSO, M. A. Medicinal plants make a comeback. **The Unesco Courier**, 1979.
- BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W. H. Natural plants chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science** 228:1154-1160, 1985.
- BALICK, M.J., COX, P.A. Plants, People, and Culture: the Science of Ethnobotany. **Scientific American Library**, New York, NY, 1997.
- BATEL, R.; JAKSIĆ, Z.; BIHARI, N.; HAMER, B.; FAFANDEL, M.; CHAUVIN, C.; SCHRÖDER, H. C.; MÜLLER, W. E.; ZAHN, R. K. A microplate assay for DNA damage determination (fast micromethod). **Anal Biochem** 1999.
- BERSANI-AMADO, C. A.; MASSAO, L. B.; BACIO, S. R. Anti-ulcer effectiveness of *Maytenus aquifolium* spray dried extract. **Phytother Res** 14: 543-545, 2000.
- BOSSOLANI, M. P. **Mecanismos moleculares da atividade antisecretora ácida gástrica e antiúlcera de frações isoladas de *Maytenus ilicifolia* Mart. e *Maytenus aquifolium* Mart.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-UFSP, São Paulo, 2000.
- BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, 2004.
- CARLINI, E. A.; FROCHTENGARTEN, M. L. Toxicologia clínica (Fase I) da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). **Publicação CEME PPPM No. 2**, Brasília- Distrito Federal, 1988.
- CARVALHO-OKANO, R. M. **Estudos taxonômicos do gênero Maytenus Mol emend. Mol. (CELASTRACEAE) do Brasil extra-amazônico**. Tese (Doutorado Ciências - Biologia Vegetal)-UNICAMP, Campinas, 1992.
- CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. An arabinogalactan isolated from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **J Nat Prod** 67: 703-706, 2004.
- CLSI – M7-A6. **Clinical Laboratory Standards Institute**, 2009.

COELHO, R. G.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W. Chemical constituents from the infusion of *Zollernia ilicifolia* Vog. and comparison with *Maytenus* species. **Journal of Biosciences**, v. 58, n. 2, p. 47-52, 2003.

COIMBRA, R.; DA SILVA, E. D. **Notas de fitoterapia**. Laboratório Clínico Silva Araújo, Rio de Janeiro, p. 32-33, 1958.

COLEY, P. D.; BRYANT, J. P.; CHAPIN IH, F. S. Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science** 230 (4728): 895-899, 1985.

CRESTANI, S.; RATTMANN, Y. D.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; IACOMINI, M.; KASSUYA, C. A. L.; MARQUES, M. C. A.; SILVA-SANTOS, J. E. A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*. **Vascular Pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 57-63, 2009.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia University Press, 1981.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In B. Buchanan, W. Grussem, R. Jones, eds, **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, 2000.

CUNICO, M. M.; CIRIO, G. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; MONTRUCCHIO, D. P.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Contribuição ao estudo da atividade antifúngica de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. **Rev. Bras. Farmacogn.** 12 (2), 2002.

CUSHNIE, T. P. and LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents**. 26, 343-56, 2005.

DOS SANTOS, V. A.; DOS SANTOS, D. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; ZANONI, M. V.; FURLAN, M. Evaluation of antioxidant capacity and synergistic associations of quinonemethide triterpenes and phenolic substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**; 11;15(10):6956-73, 2010.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiência**. 2006.

EMATER. Formas de manipular ervas medicinais. EMATER-RS/Ascar. Porto Alegre, 2012.

ESTEVAM, C. S.; CAVALCANTI, A. M.; CAMBUI, E. V. F.; ARAÚJO NETO, V.; LEOPOLDO, P. T. G.; FERNANDES, R. P. M.; ARAUJO, B. S.; PORFÍRIO, Z.; SANT'ANA A. E. G. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rígida* Mart. (Celastraceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** 19, 2009.

ESTRADA-RUIZ, E.; UPCHURCH, G. R.; WHEELER, E. A.; MACK, G. H. Late cretaceous angiosperm woods from the Crevasse canyon and Mcrae formations, New Mexico, USA: part 1. **International Journal of Plant Sciences**, 2012.

FARNSWORTH, N. R. et al. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization.** v. 63, n. 6, pp. 965-981, 1985.

FERREIRA, P. M.; OLIVEIRA, C. N.; OLIVEIRA, A. B.; LOPES, M. J.; ALZAMORA, F.; VIEIRA, M. A. R. A lyophilized aqueous extract of *Maytenus ilicifolia* leaves inhibits histamine-mediated acid secretion in isolated frog gastric mucosa. **Planta**, v. 219, n. 2, p. 319-324, 2004.

FLÜCK, H. The influence of the soil on the content of active principles in medicinal plants. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology** 6:153-163, 1954.

FONSECA, A. P. N. D.; SILVA, G. D. F.; CARVALHO, J. J; SALAZAR, G. D. C. M.; DUARTE, L. P.; SILVA, R. P; JORGE, R. M.; TAGLIATI, C. A.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A.; PERES, V.; VIEIRA FILHO, S. A. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematógenica e antiulcerogênica de extratos do decocto. **Química Nova**, São Paulo, 2007.

GEORGIOU, C. D.; PAPAPOSTOLOU, I.; GRINTZALIS, K. Protocol for the quantitative assessment of DNA concentration and damage (fragmentation and nicks). **Nat Protoc**; 4(2), 2009.

GONZALEZ, F. G.; PORTELA, T. Y.; STIPP, E. J.; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifoliuum*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **J Ethnopharmacol** 77: 41-47, 2001.

GULLO, F. P.; SARDI, J. C. O.; SANTOS, V. A. F. F. M.; SANGALLI-LEITE, F.; PITANGUI, N. S.; ROSSI, S. A.; PAULA e SILVA, A. C. A. de; SOARES, L. A.; SILVA, J. F.; OLIVEIRA, H. C.; FURLAN, M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Antifungal activity of Maytenin and Pristimerin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

HANDA, S. S.; KHANUJA, S. P. S.; LONGO, G.; RAKESH, D. D. **Extraction technologies for medicinal and aromatic plants**. ICS-UNIDO, Italy, 2008.

HARBORNE, J. B. and WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research. **Phytochemistry**, 55, 481-504, 1992.

HO, C. T.; CHEN, Q.; SHI, H. Antioxidative effects of polyphenol extract prepared from various Chinese herbs. **Prev Med**, 21: 520-525, 1992.

JACOMASSI, E. **Morfo-anatomia comparativa, caule e folha, de Maytenus ilicifolia, Maytenus aquifolia (Celastraceae) e Sorocea bonplandii (Moraceae)**. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2000.

JANZEN, D. H. **Ecologia vegetal nos trópicos**. São Paulo, EPU, EDUSP, 1980.

JOBIM, M. L.; SANTOS, R. C.; DOS SANTOS ALVES, C. F.; OLIVEIRA, R. M.; MOSTARDEIRO, C. P.; SAGRILLO, M. R.; DE SOUZA FILHO, O. C.; GARCIA, L. F.; MANICA-CATTANI, M. F.; RIBEIRO, E. E.; DA CRUZ, I. B. Antimicrobial activity of

Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. *Microbiol Res*;169(4):314-23, 2014.

JOLY, A. B. **Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

KHODAVANDI, A.; HARMAL, N. S.; ALIZADEH, F.; SCULLY, O. J.; SIDIK, S. M.; OTHMAN, F.; SEKAWI, Z.; NG, K. P.; CHONG, P.P. Comparison between allicin and fluconazole in *Candida albicans* biofilm inhibition and in suppression of HWP1 gene expression. *Phytomedicine* 19, 56. 2011.

KOLECKAR, V.; KUBIKOVA, K.; REHAKOVA, Z.; KUCA, K.; JUN, D.; JAHODAR, L.; OPLETAL, L. Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. *Mini Rev Med Chem* 8(5):436-47, 2008.

KRUL, C.; LUITEN-SCHUISTE, A.; TENFELDE, A.; OMMEM, B.; VERHAGEN, H.; HAVENAAR, R. Antimutagenic activity of green tea and black tea extracts studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Mutat Res* 474: 71-85, 2001.

KULKARNI, S. V.; MARKAD, V. L.; MELO, J. S.; D'SOUZA SF.; KODAM, K. M. Biodegradation of tributyl phosphate using *Klebsiella pneumoniae* sp. S3. *Appl Microbiol Biotechnol*;98(2):919-29, 2014.

KUPCHAN, S. M.; KARIM, A. Tumor inhibitors. 114. aloe amodin: antileukemic principle isolated from *Rhammus frangula* L. *Lloydia* 39: 223:224, 1976.

LAPA, A. J.; CADEN, S.; LIMA-LANDMAN, M. T. R. Farmacologia e toxicoloia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, 1999.

LIMA, O. G. de; BARROS COELHO, J. S. de; WEIGERT, E.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; ANDRADE LIMA, D. de; MORAES E SOUZA, M. A. de. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores - Sobre a presença de maitenina e pristimerina na parte cortical das raízes de *Maytenus ilicifolia*, procedente do Brasil Meridional. *Revista do Instituto de Antibióticos* II(I):35-38, 1971.

LORENZI, H.; MATOS F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

MAGALHÃES, P. M. **O caminho medicinal das plantas: aspectos sobre o cultivo**. Campinas: RZM Press UNICAMP, 1997.

MAGALHÃES, P. M. **Agrotecnologia para o cultivo da espinheira santa**. CPQBA-UNICAMP, 2004.

MANDICH, L.; BITTNER, M.; SILVA, M.; BARROS, C. Phytochemical screening of medicinal plants - studies of flavonoids. *Ver. Latinoamer. Quirn.* 15(2):80-82, 1984.

MELO, S. F.; SOARES, S. F.; COSTA, R. F.; DA SILVA, C. R.; OLIVEIRA, M. B. N.; BEZERRA, R. J. A. C.; CALDEIRA-DE-ARAUJO, A.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of

the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutat Res** 496: 33-38, 2001.

MENDES, B. G.; MACHADO, M. J.; FALKENBERG, M. Triagem de glicolipídios em plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn**, 2006.

MING, L. C.; CASTRO, D. M.; DELACHIAVE, M. E. **Plantas medicinais aromáticas e condimentares**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1998.

MONTANARI, T.; DE CARVALHO J. E.; DOLDER, H. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss on epermato genesis. **Contraception** 57: 335-339, 1998.

MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception** 65: 171-175, 2002.

MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L.; CARVALHO, A. Z.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V.; MAZUTTI, M.; FILHO, I. N.; ECHEVERRIGARAY, S. Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using high-pressure CO₂. **Fitoterapia**, 2004.

MURAKAMI, S.; MURAMATSU, M.; OTOMO, S. Gastric H⁺ K⁽⁺⁾ ATPase inhibition by catechins. **J Pharm Pharmacol** 44: 926-928, 1992.

NAKAMURA, M.; KAKASUMI, T.; MINAGAWA, Y.; YOSHIZAWA, T. *Maytenus ilicifolia* extracts, especially quercetin-3-O-glucoside, as analgesic and anti-inflammatory agents. **Japan Kokai Tokkyo Koho**, v. 96, p. 981, 1994.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod**, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat Prod Rep**, 2000.

OHSAKI, A.; IMAI, Y.; NARUSE, M.; AYABE, SI.; KOMIYAMA, K.; TAKASHIMA, J. Four new triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. **J Nat Prod**, 2004.

OKABE, S.; OCHIAI, Y.; AINDA, M.; PARK, K.; KIM, S. J.; NOMURA, T.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H. Mechanistic aspects of green tea as a cancer preventive: effect Components on human stomach cell lines. **Jpn J Cancer Res** 90: 733-739, 1999.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; CAETANO, L. C. **Plantas medicinais – Do popular ao científico**. Edufal. Maceió, 2005.

PELT, J. M. Medicine's "green revolution". **The Unesco Courier**, 1979.

PESSUTO, M. B. **Análise fitoquímica de extratos de folhas de Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss. e avaliação do potencial antioxidante**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

PETERSON, E. J.; KIREEV, D.; MOON, A. F.; MIDON, M.; JANZEN, W. P.; PINGOUD, A.; PEDERSEN, L. C.; SINGLETON, S. F. Inhibitors of *Streptococcus pneumoniae* Surface Endonuclease EndA Discovered by High-Throughput Screening Using a PicoGreen Fluorescence Assay. **J Biomol Screen**; 18(3):247-57, 2013.

PIP, E. Toxic plants in Prairie Garden, **Prairie Garden Annual**, 2006.

QUEIROGA, C. L.; SILVA, G. F.; DIAS, P. C.; POSSENTI, A. Evaluation of the anti-ulcerogenic activity of friedelan-3-beta-ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* M. (Celastraceae). **J Ethnopharmacol** 72: 465-468, 2000.

RAPP, R.P. Changing strategies for the management of invasive fungal infections. **Pharmacotherapy**, 2004.

RATTMANN, Y. D.; CIPRIANI, T. R.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A.; SILVA-SANTOS, J. E. Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (Celastraceae) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 3, p.385-391, 2006.

REIS, M. S.; SILVA, S. R. **Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: Maytenus spp., espinheira-santa**. Brasília: IBAMA, 2004.

REISSEK, S. Celastrineae, Ilicineae, Rhamneae. In: MARTIUS, C. F. P. & EICHLER, A. G. (eds.). **Flora Brasiliensis**, Typographia Regia, Monachii, v. 11, pt. 1, 1861.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotecnologia**. São Paulo, Editorial Premier, 1997.

ROSA, S. G. T. **Caracterização das sementes de Maytenus ilicifolia Mart, ex Reiss, Espinheira Santa, e viabilidade de sua propagação sexuada**. Dissertação (mestrado Agronomia - Fitotecnia)-UFRGS, Porto Alegre, 1994.

SANTANA, C. F.; ASFOR, J. J.; COTIAS, C. T.; Primeiras observações sobre o emprego da maitenina em pacientes cancerosos. **Ver Inst Antibióticos** 11, 1971.

SEGREDOS e virtudes das plantas medicinais. Reader's Digest Brasil Ltda., 1999.

SHEFFER, M. C.; CORRÊA JUNIOR, C.; GRAÇA, L. R. Aspectos da cadeia produtiva da Espinheira-santa. In: **Complexo agroindustrial das plantas medicinais, aromáticas e condimentares no Estado do Paraná: diagnósticos e perspectivas**. EMATER Paraná. Curitiba, 2004.

SHIMIZU, M.; TOMOO, T. Anti-inflammatory constituents of topically applied drugs v: constituents with anti-inflammatory from Aoki (*Aukuba japonica* Thunb.) **Bio Pharm Bull** 17, 1994.

SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. **Phytochemistry**, 1994 .

- SILVA, A. R. H.; MOREIRA, L. R.; BRUM, E. S.; FREITAS, M. L.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ROMAN, S. S.; MAZZANTI, C. M.; BRANDÃO, R. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 53: 908-916, 2014.
- SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A., SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Editora UFRGS, Porto Alegre, 1986.
- SIMÕES, C. M. O.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4.ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 821 p. ISBN 85-7025-479-2, 2002.
- SINGH, B.; DUBEY, M. M. Estimation of triterpenoids from *Heliotropium maifolium* Kohen ex Retz *in vivo* and *in vitro*: antimicrobial screening. **Phytother Res** 15, 2001.
- SOUZA-FORMIGONI, M. L.; OLIVEIRA, M. G.; MONTEIRO, M. G.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A.. Antiulcerogenics effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J Ethnopharmacol**, 34: 21-27. 1991.
- SROKA, Z. Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. **Naturforsch C**; 60(11-12):833-43, 2005.
- STELLFELD, C. A. A espinheira-santa: contribuição ao estudo farmacognóstico. **Bol. Assoc. Bras. Pharm.** 15:551-571, 1934.
- TABACH, R.; OLIVEIRA, W. P. Evaluation of the antiulcer activity of a dry extract of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. produced by a jet spouted bed dryer. **Pharmazie**, v. 58, p. 573-576, 2003.
- TIBERTI, L. A.; YARIWAKE, J. H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 846, 2006.
- TRAVASSOS, I. O.; MIRANDA, K. C. V. Resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. **Infarma**, v.22, 2010.
- VAN DER HEIJDEN, J.; BOSMAN, E. S.; REYNOLDS, L. A.; FINLAY, B. B. Direct measurement of oxidative and nitrosative stress dynamics in *Salmonella* inside macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 13;112(2):560-5, 2015.
- VARGAS, V. M. F.; MOTTA, V. E. P.; ALICE, C. B.; GUIDOBONO, R. R.; HENRIQUES, J. A. P. Estudo da atividade mutagênica de extratos vegetais com uso em medicina popular. **Rev. Bras. Farm.** 70(3):65-67, 1989.
- VEIGA JUNIOR, V. F., PINTO, A. C., MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, 2005.
- VEIGA JUNIOR, V. F., PINTO, A. C. **Química Nova**, v. 25, p. 273, 2002.

VELLOSA, J. C.; KHALIL, N. M.; FORMENTON, V. A.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitoterapia**. 77(3):243-4, 2006.

VIEIRA, L. S.; ALBUQUERQUE, J. M. **Fitoterapia tropical – manual de plantas medicinais**. Pará, p. 113-114, 1998.

YAMANE, T.; TAKAHASHI, T.; KUWATA, K.; OYA, K.; INAGAKE, M.; KITAO, Y.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H. Inhibition of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced carcinogenesis by (-)-epigallocatechin gallate in the rat glandular stomach. **Cancer Res** 55: 2081-2084, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Antimicrobial resistance. N. 194, 2015. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Acesso em 28 dez 2015.

ZACHÉ, J. Plantas medicinais fitoterápicos. **Revista Isto É**, junho 2001.