

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE TANINOS EXTRAÍDOS DE
FOLHAS DE *Psidium guineense* Sw. (MYRTACEAE)

CINTHIA GRACIELLY RODRIGUES

MONTES CLAROS, MINAS GERAIS
2008

CINTHIA GRACIELLY RODRIGUES

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE TANINOS EXTRAÍDOS DE FOLHAS DE *Psidium guineense* Sw. (MYRTACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Montes Claros como requisito necessário para a conclusão do curso de Mestrado em Ciências Biológicas.

APROVADA: 19 de Dezembro de 2008

D.Sc. Dario Alves de Oliveira
Orientador/UNIMONTES

D.Sc. Geraldo Aclécio Melo
UNIMONTES

D.Sc. Igor Viana Brandi
VALLÉE

CINTHIA GRACIELLY RODRIGUES

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE TANINOS EXTRAÍDOS DE
FOLHAS DE *Psidium guineense* Sw. (MYRTACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Montes Claros como requisito necessário para a conclusão do curso de Mestrado em Ciências Biológicas.

Orientador: D.Sc. Dario Alves de Oliveira

Montes Claros
2008

Rodrigues, Cinthia Gracielly.

R696a Atividade antibacteriana de taninos extraídos de folhas de *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae) [manuscrito] / Cinthia Gracielly Rodrigues. – 2008.

57 f. : il.

Bibliografia: f. 54-56.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2008.

Orientador: Prof. Dr. Dario Alves de Oliveira.

1. *Psidium guineense*. 2. Taninos. 3. Isolamento. 4. Atividade antibacteriana I. Oliveira, Dario Alves de. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A ti, meu Deus, supremo criador, eu agradeço, pelas obras de tuas mãos, porque sem a tua perfeita criação, este trabalho não teria sido possível.

Agradeço por todos aqueles que levantaste para desenvolverem este trabalho juntamente comigo: Rafael, Bárbara, Dayane, Cintia, Juliane, Rayane, Paulo Henrique, Diego e Cristina. E pelos outros colegas do Laboratório de Métodos Analíticos da Universidade Estadual de Montes Claros, com os quais compartilhei momentos muito agradáveis ao longo deste período. Também agradeço pelo apoio logístico conseguido junto a essa Universidade e pelo apoio financeiro obtido da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Também te dou graças por aqueles que abriram as portas de suas instituições para que alguns equipamentos fossem utilizados: o Laboratório de Tecnologia de Vacinas da empresa Vallée S.A., o Laboratório de Plantas Medicinais do Núcleo de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, e as Faculdades de Saúde Ibituruna.

Agradeço pelo orientador Professor Dario, pela confiança em mim depositada, e também pelos co-orientadores Professores Ronaldo e Henrique, que também foram indispensáveis na realização deste trabalho.

Pela paciência e compreensão que deste ao meu marido, Carlos, e ainda por todos os meus familiares, em especial meu Pai e minha mãe, pelo apoio e cuidado.

Também agradeço pelo apoio conseguido junto a Secretaria de Estado de Educação de Minas Gerais, que me concedeu afastamento para realização deste trabalho. E de maneira alguma poderia me esquecer daqueles que dobraram seus joelhos, intercedendo por mim: a amada Igreja Batista Monte Sião.

Enfim, por todos os que me abençoaram, eu te rogo, dê-lhes uma porção triplicada do que me concedestes. Porque por meio da tua atuação na vida de cada um destes, posso dizer que *até aqui me ajudou o Senhor*.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Considerações gerais sobre plantas medicinais	1
1.2 Família Myrtaceae	3
1.3 <i>Psidium guineense</i> Swartz.....	4
Referências Bibliográficas	5
2 OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivos específicos	8
3 CAPÍTULO 1 - Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> de frações semipuras do extrato de <i>Psidium guineense</i> Sw. (Myrtaceae).....	9
3.1 Introdução	9
3.2 Material e Métodos	12
3.2.1 Coleta do material botânico	12
3.2.2 Extração	12
3.2.2.1 Tratamento pré-extracão 1	13
3.2.2.2 Tratamento pré-extracão 2	13
3.2.2.3 Preparação do Extrato Metanólico Bruto	13
3.2.3 Semipurificação do Extrato Metanólico Bruto	14
3.2.4 Determinação do rendimento do extrato bruto e das frações	14
3.2.5 Atividade Antibacteriana	15
3.2.5.1 Difusão em ágar - Variante Poço	15
3.2.5.2 Difusão em ágar - Variante Disco	16
3.2.6 Análise estatística	16
3.3 Resultados e Discussão	17

3.3.1 Extração e semipurificação do extrato bruto	17
3.3.2 Atividade antibacteriana	18
3.4 Conclusões	24
Referências Bibliográficas	25
4 CAPÍTULO 2 - Isolamento, quantificação e avaliação da atividade antibacteriana de taninos de <i>Psidium guineense</i> Sw. (Myrtaceae).....	29
4.1 Introdução	29
4.2 Material e Métodos	35
4.2.1 Coleta do material botânico	36
4.2.2 Isolamento de taninos	35
4.2.2.1 Extração	36
4.2.2.2 Método A	36
4.2.2.3 Método B	37
4.2.3 Determinação do rendimento do extrato bruto e das frações eluídas das colunas	38
4.2.4 Quantificação de taninos totais	39
4.2.4.1 Método de difusão radial	39
4.2.5 Atividade Antibacteriana	40
4.2.5.1 Difusão em ágar - Variante Poço	40
4.2.5.2 Difusão em ágar - Variante Disco	40
4.2.6 Análise estatística	41
4.3 Resultados e Discussão	42
4.3.1 Isolamento de taninos	42
4.3.2 Quantificação de taninos totais	44
4.3.3 Atividade Antibacteriana	47
4.4 Conclusões	53
Referências Bibliográficas	54
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Rendimento das frações (Éter de Petróleo, Dicloromentano, Acetato de Etila, n-Butanol e Aquosa) obtidas a partir do Extrato Metanólico Bruto obtido de material seco (EMBS) e de material fresco (EMBF).	17
Tabela 2:	Rendimento das frações eluídas da coluna com etanol e com acetona, empregando-se os métodos de isolamento A e B, para ambos os tipos de material vegetal (Fresco e Seco).	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Mapa do local de coleta das folhas de <i>Psidium guineense</i> .	12
Figura 2:	Esquema de preparação do Extrato Metanólico Bruto.	13
Figura 3:	Esquema de semipurificação do Extrato Metanólico Bruto.	14
Figura 4:	Medidas do diâmetro do halo de inibição do crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em função das frações semipuras e dos controles positivo (tetraciclina) e negativo (DMSO).	19
Figura 5:	Medidas do diâmetro do halo de inibição do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em função das frações semipuras e dos controles positivo (cloranfenicol) e negativo (DMSO).	20
Figura 6:	Testes antibacterianos de difusão em ágar, variante disco (esquerda) e variante poço (direita), realizados com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (acima) e <i>Staphylococcus aureus</i> (abaixo), em que foram utilizados extrato bruto e frações, oriundos do material vegetal seco de <i>P. guineense</i> .	21
Figura 7:	Pentagalloylglucose - Precursor de galotaninos e elagitaninos.	30
Figura 8:	Catequina - monômero básico dos taninos condensados.	31
Figura 9:	Folhas de <i>Psidium guineense</i> coletadas no município de Glaucilândia (norte de Minas Gerais).	35

Figura 10:	Fluxograma de preparação do extrato bruto (acetona 70%).	36
Figura 11:	Esquema dos dois métodos de isolamento A e B, com demonstração da diferença existente entre ambos.	38
Figura 12:	Monitoramento de fracionamento de compostos fenólicos por adsorção em sephadex LH-20 e eluição com etanol 95% (em 280 nm) seguida por acetona 50% (em 435 nm).	43
Figura 13:	Curvas de Calibração de Ácido Tântico (método de difusão radial em gel de agarose).	45
Figura 14:	Ilustração dos halos de precipitado tanino-proteína, formados na quantificação de taninos totais dos extratos metanólicos brutos, seco (esquerda) e fresco (direita), de <i>Psidium guineense</i> , pelo método de difusão radial em gel de agarose.	46
Figura 15:	Ilustração dos halos de precipitado tanino-proteína formados na quantificação de taninos totais das amostras oriundas dos métodos de isolamento A (direita) e B (esquerda), de material seco, de <i>Psidium guineense</i> , pelo método de difusão radial em gel de agarose.	46
Figura 16:	Medidas do diâmetro do halo de inibição do crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , formados por amostras oriundas dos métodos de isolamento e pelos controles (positivo e negativo), em função do material vegetal utilizado (seco e fresco).	48
Figura 17:	Medidas do diâmetro do halo de inibição do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> , formados por amostras oriundas dos métodos de isolamento e pelos controles (positivo e negativo), em função das variantes do método de difusão em ágar.	49

Figura 18: Testes antibacterianos de difusão em ágar, mostrando os halos de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* (acima) e *Pseudomonas aeruginosa* (abaixo) formados pelas amostras obtidas dos isolamentos A e B.

51

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância

ATCC: American Type Culture Collection

DMSO: DimetilSulfóxido

EMB: Extrato Metanólico Bruto

EMBS: Extrato Metanólico Bruto oriundo de material Seco

EMBF: Extrato Metanólico Bruto oriundo de material Fresco

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

BHI: Bain-hearth-infusion agar

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

RESUMO

Atividade antibacteriana de taninos extraídos de folhas de *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae)

RODRIGUES, Cinthia Gracielly . Ms. Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Montes Claros. Dezembro, 2008. Orientador: D.Sc. Dario Alves de Oliveira. Co-orientadores: D.Sc. Henrique Maia Valério e D.Sc. Ronaldo Reis Júnior.

Extratos metanólicos de folhas secas e frescas de *Psidium guineense*, coletadas no município de Glauçilândia (MG) foram submetidos à purificação por meio de extrações sucessivas com solventes de polaridade crescente: éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e butanol. Os resíduos das frações foram submetidos a teste antibacteriano contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, por meio das duas variantes do método de difusão em ágar (disco e poço). Todas as frações apresentaram atividade antibacteriana. A partir destes resultados, foi preparado um extrato de *P. guineense* com acetona 70%, de folhas secas e frescas, a fim de isolara taninos da planta e avaliar se o teor destes compostos na amostra apresentava alguma relação com a atividade antibacteriana observada no teste inicial. Dessa forma, o extrato foi aplicado a uma coluna de sephadex LH-20 e duas metodologias foram utilizadas para o isolamento. Os taninos presentes nas amostras isoladas foram quantificados e as amostras foram submetidas a teste antibacteriano. As amostras obtidas por meio dos dois métodos de isolamento apresentaram alto teor de taninos e inibiram o crescimento bacteriano. Os compostos responsáveis pela atividade antibacteriana das amostras ricas em taninos foram extraídos com maior eficiência das folhas secas e a variante poço do método de difusão em ágar apresentou maior sensibilidade a difusão destes compostos.

Palavras-chave: *Psidium guineense*. taninos. isolamento. atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Antibacterial activity of extracted tannins of leaves of *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae)

RODRIGUES, Cinthia Gracielly . Ms. Biological Sciences. Universidade Estadual de Montes Claros. December, 2008. Advisor: D.Sc. Dario Alves de Oliveira. Co-advisor: D.Sc. Henrique Maia Valério and D.Sc. Ronaldo Reis de Oliveira.

Methanolic extracts from dried and fresh leaves of *Psidium guineense*, collected in Glauçilândia (MG) city, were submitted to purification by successives extractions with rising polarity solvents: ether oil, dichloromethane, ethylacetate and butanol. The residues from fractions were submitted to antibacterial test against cepas of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, by two variants of the agar diffusion method (disc and well). All fractions showed antibacterial activity. According to these results, it was prepared an extract with 70% acetone of dried and fresh leaves of *P. guineense*, in order to isolate tannins from the plant and evaluate if the content of these compounds in the samples had relation with antibacterial activity observed in the initial test. Thus, the extract was applied to a column of sephadex LH-20 and two methodologies were used for the isolation. The tannins present in the isolated samples were quantified and the samples were submitted to antibacterial test. The samples gotten by two methods of isolation showed a high content of tannins and inhibited the bacterial increasing. The compounds responsible for the antibacterial activity of the samples rich in tannins were extracted with major efficiency from dried leaves and the well variant of the diffusion method was more sensitive to the diffusion from these compounds.

Keywords: *Psidium guineense*. tannins. isolation. antibacterial activity.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Considerações gerais sobre plantas medicinais

A utilização de diversas espécies de plantas para fins medicinais é tão antiga quanto à própria história da humanidade (TYRREL, 1990; VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2005). Por meio da observação e da experimentação pelos povos primitivos, as propriedades terapêuticas das plantas foram descobertas e propagadas de geração em geração (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica se iniciou, e até certo tempo, ocorreu de forma paralela ao estudo das plantas. Os primeiros estudos dos vegetais, com base científica, registrados no século XIX, resultaram no isolamento de algumas substâncias, que se consagraram como princípios ativos eficazes, e que, até hoje, são empregadas no tratamento de doenças, a exemplo da morfina, quinina, cânfora, e cocaína (MONTARI e BOLZANI, 2001).

No século XX, o grande progresso da indústria farmacêutica, com a descoberta e o desenvolvimento de processos de síntese de compostos orgânicos, culminou no desenvolvimento de diversos medicamentos sintéticos. O acesso a estes medicamentos resultou no desinteresse pelo estudo das plantas medicinais, o que levou ao obscurecimento do extraordinário potencial desses vegetais. Entretanto, efeitos colaterais causados pelos medicamentos sintéticos, somados aos seus altos valores, promoveram a busca por novas drogas, como alternativa de tratamento (VOLAK e STODOLA, 1990).

O acesso diferenciado às fontes alopatásicas de tratamento, devido ao elevado custo dos medicamentos, motivou a Organização Mundial de Saúde em 1978 a incentivar a pesquisa de plantas medicinais (OLIVEIRA e AKISUE, 1997), uma vez que 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependem desses recursos naturais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (GONÇALVES *et al.*, 2005).

A busca por novas alternativas terapêuticas, aliada às tendências globais de desenvolvimento sustentável e valorização da biodiversidade fizeram ressurgir, ainda no século passado, o interesse pela comprovação das propriedades farmacológicas das plantas. A corrida de algumas indústrias transnacionais por substâncias bioativas novas foi intensificada nos anos 90, especialmente nas florestas tropicais, onde se concentra grande parte da biodiversidade (PINTO *et al.*, 2002). Isso porque, a diversidade química associada à diversidade biológica, encontrada em ecossistemas terrestres e aquáticos, é um importante

aspecto a ser considerado em processos e diretrizes de desenvolvimento de novos biofármacos (MARASCHIN e VERPOORTE, 1999). De fato, o número de espécies realmente conhecidas e utilizadas como medicamentos é pequeno, frente à enorme biodiversidade vegetal e a devastação causada pelo homem (GOTTLIEB e KAPLAN, 1990).

Nessa questão de biodiversidade, o Brasil é um país privilegiado, considerando que possui a maior diversidade genética vegetal do mundo (GUERRA e NODARI, 1999) e 30% das florestas tropicais do planeta (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998). Aqui, o uso de plantas medicinais, além de influências africanas e européias, tem suas raízes fortemente ligadas à cultura indígena. Todas essas influências contribuíram para o enriquecimento da cultura popular, e podem servir como embasamento para estudos científicos (MARTINS *et al.*, 1994). Entretanto, as pesquisas realizadas para a avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes (VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2005) e a grande maioria das espécies brasileiras continua sem qualquer estudo químico ou biológico (PINTO *et al.*, 2002). Apesar de sua condição privilegiada de biodiversidade, plantas medicinais exóticas, cujos valores de importação superam amplamente os de exportação, ainda são muito utilizadas no Brasil (FONTE, 2004).

As propriedades medicinais apresentadas pelas plantas se devem a fantástica variedade e complexidade de metabólitos especiais biosintetizados por estas. Estes metabólitos teriam se formado e evoluído como mecanismo de defesa dos vegetais às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação. Pode-se afirmar, dessa forma, que as plantas constituem num enorme laboratório de síntese orgânica, fruto de milhões de anos de evolução e adaptação sobre a terra (MONTARI e BOLZANI, 2001); e, assim, possui grande valor agregado, devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO *et al.*, 2002).

Na década de 80 foram identificados 121 compostos de origem vegetal, provenientes de 95 espécies, os quais têm sido usualmente empregados como terapêuticos nos países ocidentais. Além disso, do total de medicamentos aprovados no período de 1983-1994, 6% foram obtidos diretamente de espécies vegetais, 24% são compostos derivados e 9% foram desenvolvidos a partir de compostos de vegetais, cuja estrutura molecular serviu como unidade precursora em processo de síntese (MARASCHIN e VERPOORTE, 1999). São exemplos de medicamentos sintéticos desenvolvidos a partir de substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas, a procaína, cloroquina, vimblastina, vincristina, podofilotoxina, taxol e camptotecina (PINTO *et al.*, 2002).

Além da busca por substâncias com estruturas moleculares complexas, outro grande alvo da indústria farmacêutica são os compostos quirais, tendo em vista a grande dificuldade de se produzir uma síntese assimétrica no laboratório, que, no entanto, é realizada de maneira excepcional pelas plantas. A preocupação com estes produtos intensificou-se depois dos graves efeitos causados por drogas como a talidomida, por exemplo. Sabe-se hoje, que a teratogênese fetal é decorrente da ação do enantiômero (-) (MONTARI e BOLZANI, 2001).

Diante do exposto, pode-se afirmar que os produtos naturais são uma alternativa terapêutica extremamente viável. Estes produtos são importantes no fornecimento de princípios ativos para o descobrimento de novas drogas, e consistem em uma alternativa mais econômica no controle de doenças para países em desenvolvimento, onde a maioria das drogas é importada (XU e LEE, 2001).

1.2 Família Myrtaceae

As espécies da família Myrtaceae são fontes promissoras para serem exploradas, por meio de estudos químicos e farmacológicos. Classes de substâncias químicas com atividades farmacológicas importantes já foram isoladas de plantas dessa família, tais como flavonóides, monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos e taninos (LEE *et al.*, 2000; SALIB e MICHAEL, 2004; BEGUM *et al.*, 2002).

A família Myrtaceae é constituída por árvores e arbustos que apresentam tronco com córtex esfoliante, folhas simples, geralmente opostas, com margens inteiras, de coloração sempre-verde, e flores geralmente brancas e bissexuadas (BARROSO *et al.*, 1984; LORENZI, 2002). Essa família apresenta cerca de 130 gêneros e 4000 espécies (LORENZI, 2002). Destes, 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies ocorrem no Brasil, tornando a Myrtaceae uma das famílias lenhosas dominantes em várias formações vegetais brasileiras (KAWASAKI e LANDRUM, 1997).

Uma das características marcantes das mirtáceas é a presença, em seus órgãos vegetativos e reprodutivos, de estruturas secretoras de óleos essenciais (BARROSO *et al.*, 1984). LIMA *et al.* (2006) demonstraram o potencial antibacteriano contra microrganismos gram-positivos dos óleos essenciais de espécies de Myrtaceae nativas da Mata Atlântica. Além da ocorrência de cavidades secretoras de óleos essenciais, as folhas das mirtáceas são caracterizadas ainda pela abundância notável de taninos e de cristais de oxalato de cálcio (METCALFE e CHALK, 1950). Segundo CARVALHO *et al.* (2002), muitas espécies dessa família apresentam empregos terapêuticos, como antiinflamatório, antineoplásico, antiviral, e

são utilizadas na medicina popular no controle de diarréias e outros distúrbios gastrointestinais.

1.3 *Psidium guineense* Swartz

A espécie *Psidium guineense*, popularmente conhecida como araçá, é um arbusto de 2 a 2,5 m de altura, pertencente a família Myrtaceae, nativo e de ampla dispersão na América Tropical. Seu tronco possui uma casca lisa, que se descama. Seus frutos lembram a goiaba, embora sejam mais ácidos e de perfume mais acentuado. Além disso, os frutos são pequenos e globosos, às vezes ovóides, pedunculados, de cor amarela-clara quando maduros e apresentam polpa de cor creme com numerosas sementes (GONZÁLEZ *et al.*, 2005).

O araçazeiro apresenta potencial para exploração econômica devido à boa aceitação de seus frutos para consumo *in natura*, pelo elevado teor de vitamina C, além da alta capacidade de dispersão, frutificação e resistência a doenças e pragas (RASEIRA e RASEIRA, 1994). A propagação do araçazeiro dá-se predominantemente por sementes, uma vez que a propagação vegetativa não tem apresentado resultados satisfatórios (NACHTIGAL e FACHINELLO, 1994).

As raízes de *P.guineense* são tidas como diuréticas e antidiarréicas e suas cascas podem ser utilizadas para aplicação em curtumes, devido ao elevado teor de taninos (RODRIGUES e CARVALHO, 2001). Por esse motivo, essa espécie é utilizada no Brasil como planta medicinal em decocções de raízes para o tratamento de enfermidades do trato urinário, diarréia e disenteria (GONZÁLEZ *et al.*, 2005). Pesquisas que objetivam avaliar as potencialidades farmacológicas apresentadas por essa espécie, devem ser incentivadas, uma vez que é usada tradicionalmente na medicina popular brasileira, e escassos são os estudos a seu respeito.

Referências Bibliográficas

- BARROSO G.M.; GUIMARÃES E.F.; ICHASO, C.F.; COSTA, C.G.; PEIXOTO, A.L.; LIMA H.C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** V 2. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1984. 377p.
- BEGUM, S.; HASSAN, S.I.; SIDDIQUI, B.S.; SHAHEEN, F.; GHAYUR, M.N.; GILANI, A.H. Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. **Phytochemistry.** v. 61, p. 399–403, 2002.
- CARVALHO, A.A.T.; SAMPAIO, M.C.C.; SAMPAIO, F.C.; MELO, A.F.M.; SENA, K.X.F.R.; CHIAPPETA, A.A.; HIGINO, J.S. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram-negativas. **Acta Farmacêutica Bonarense.** v. 21, n. 4, p. 255-258, 2002.
- CECHINEL FILHO, V. e YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova.** v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- FONTE, N.N. **A complexidade das plantas medicinais: algumas questões atuais de sua produção e comercialização.** 2004. 183f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico.** v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.
- GONZÁLEZ, A.M.N.; GONZÁLEZ, M.B.R.; PINTO, N.L.S. Phytochemical study and antibacterial activity of *Psidium guineense* Sw (choba) against *Streptococcus mutans*, causal agent of dental caries. **Revista Cubana Plantas Medicinais.** v. 10, n. 3-4, p. 0-0, 2005. Disponível em: <http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol10_3-4_05/pla083-405.pdf> Acesso em: 10 mar. 2008.
- GOTTLIEB, O.R. e KAPLAN, M.A.C. Amazônia: Tesouro químico a preservar. **Ciência hoje.** v. 61, p. 17-29, 1990.
- GUERRA, M.P. e NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora UFRGS, 1999. p. 13-28.
- KAWASAKI, M.L. e LANDRUM, L.R. A rare and potentially economic fruit of Brazil - cambuci, *Campomanesia phaea* (Myrtaceae). **Economic Botany.** v. 51. p. 403-407, 1997.
- LEE, M.H.; CHIOU, J.F.; YEN, K.Y.; YANG, L.L. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Letters.** v. 154, n. 7, p. 131-136, 2000.

LIMA, M. E. L.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M. ; SOBRAL, M. ; MORENO, P. R. H. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas da família Myrtaceae nativas do estado de São Paulo. In: XIX SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, 2006. Salvador. **Resumos** ..., Salvador: s.ed., 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. V 2. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 368p.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 23, p. 24-28, 1999.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C., DIAS; J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Editora UFV, 1994. 220p.

METCALFE, C.R. e CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. V 1. Oxford: Clarendon Press, 1950. 1500p.

MONTARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

NACHTIGAL, J.C. e FACHINELLO, J.C. Efeito da época de coleta das estacas de araçazeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13, 1994. Salvador. **Resumos**..., Salvador: SBF, 1994.

OLIVEIRA, F. e AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1997. 178p.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**. v. 25, n. 1, p. 25-61, 2002.

RASEIRA, A. e RASEIRA, M.C.B. “Ya - cy”, Cultivar de araçazeiro lançada pela EMBRAPA / CPACT. **Hirti Sul**, Pelotas, v.3, n.1, p.37-39, 1994.

RODRIGUES, V.E.G. e CARVALHO, D.A. **Plantas Medicinais no Domínio dos Cerrados**. Lavras: Editora UFLA, 2001. 180p.

SALIB, J. Y. e MICHAEL, H. N. Cytotoxic phenylethanol glycosides from *Psidium guaijava* seeds. **Phytochemistry**. v. 65, p. 2091–2093, 2004.

TUROLLA, M.S.R. e NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

TYRREL, M.H. Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies. **Food Technology**. v. 44. p. 68-72, 1990.

VEIGA JUNIOR, V.F. e PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**. v. 28, p. 519-528, 2005.

VOLAK, J. e STODOLA, J. **Plantas Medicinais**. São Paulo: Inquérito, 1990. 319p.

XU, H.X.; LEE, F. Song activity of plant flavonoids against antibiotic- resistant bacteria.
Phytotherapy Research. v. 15, p. 30-43, 2001.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antibacteriano das frações semipuras e de taninos obtidos a partir do extrato de folhas de *Psidium guineense* Sw.

2.2 Objetivos específicos

Fracionar o extrato das folhas de *Psidium guineense* por meio de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente e avaliar as frações semipuras quanto ao seu potencial antibacteriano.

Isolar e quantificar taninos presentes nas folhas de *Psidium guineense*.

Avaliar a atividade antibacteriana de taninos isolados das folhas de *Psidium guineense*.

Avaliar a influência do material vegetal (fresco e seco) utilizado nas extrações e das variantes do método de difusão em ágar (disco e poço) nos resultados dos testes realizados.

3 CAPÍTULO 1 - Atividade antibacteriana *in vitro* de frações semipuras do extrato de *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae)

3.1 Introdução

Os antimicrobianos são substâncias que provocam morte ou inibição do crescimento de microrganismos. Estas substâncias agem por meio da interferência em processos metabólicos, como na replicação cromossômica e na inibição da síntese protéica, ou causam danos nas estruturas do microrganismo, como parede celular e membrana citoplasmática (BARROS *et al.*, 2001).

Os antimicrobianos se diferem em suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, quanto ao espectro e modo de ação. De acordo com este último parâmetro, GOODMAN e GILMAN (1996), classificam os antimicrobianos como: agentes que inibem a síntese da parede celular bacteriana (penicilinas e cefalosporinas); agentes que afetam a permeabilidade da membrana celular do microrganismo, o que resulta no extravasamento de compostos intracelulares (polimixina); agentes que inibem a síntese protéica (cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina, clindamicina e aminoglicosídeos); agentes que afetam o metabolismo dos ácidos nucléicos (rifampicinas e quinolonas); agentes que bloqueiam etapas metabólicas específicas, essenciais aos microrganismos (trimetoprima e sulfonamidas).

O desenvolvimento da quimioterapia antimicrobiana teve início na década de 30 com a descoberta das sulfonamidas e penicilinas (JAWETZ *et al.*, 1998). Porém nas subsequentes décadas de 50 e 70, epidemias por *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina e linhagens multiresistentes (MRSA - methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), chamaram a atenção para o problema da resistência aos antimicrobianos (COUTO e PEDROSA, 1999). *Staphylococcus aureus* são cocos gram-positivos, causadores de infecções de caráter oportunistas em seres humanos e animais, e atuam como agentes de uma ampla gama de infecções, desde aquelas localizadas, geralmente superficiais (pele e tecido subcutâneo), até algumas disseminadas (endocardite, artrite, osteomielite, pneumonia) com elevada gravidade (TRABULSI *et al.* 2005). Atualmente, *S. aureus* meticilina resistente, é o maior patógeno causador de infecções hospitalares e é responsável por inativar a ação de vários antibióticos, tornando a multiresistência, um grande problema de saúde pública (STRATTON, 2000).

Pseudomonas aeruginosa é outro patógeno de grande importância clínica, uma vez que se encontra entre os agentes mais comuns de infecções nosocomiais, segundo dados da ANVISA (2004). Estes microrganismos são bacilos gram-negativos, causadores de infecções tipicamente oportunistas em processos cirúrgicos, queimaduras, pós-cateterização urinária e

pneumonias, principalmente após procedimentos de entubação. Uma das características da espécie é a capacidade de produzir um pigmento azul-esverdeado denominado piocianina e pioverdina (KONEMAN *et al.*, 2001; TRABULSI *et al.*, 2005).

Embora grande número de antimicrobianos tenha sido produzido nas últimas décadas pelas indústrias farmacêuticas, a resistência por parte dos microrganismos a estas drogas tem aumentado. O fenômeno da resistência ocorre devido a inúmeros mecanismos complexos e ainda não completamente entendidos, tais como a capacidade de evitar algumas rotas metabólicas inibidas pelo antibiótico, a produção de beta-lactamases que degradam o agente antimicrobiano ou ainda a alterações no transporte do antibiótico através da membrana bacteriana. Certo é que o aumento da resistência tem ocorrido devido ao emprego indiscriminado dos antibióticos em pacientes e também na criação de animais e em plantas (BARROS *et al.*, 2001).

Dentre as medidas que devem ser tomadas para evitar ou diminuir a resistência bacteriana, encontra-se o desenvolvimento de novos medicamentos (WANNMACHER, 2004). E uma vez que as plantas produzem inúmeras substâncias biologicamente ativas, tem-se nos produtos naturais uma fonte importante de recursos (PEREIRA, 2006).

A busca por novos agentes antimicrobianos se faz necessária tanto pelo aumento da resistência bacteriana como pelo surgimento de infecções oportunistas fatais, associadas a AIDS, a quimioterapia antineoplásica e a transplantes (PENNA *et al.*, 2001). Dessa forma, espera-se que tais pesquisas contribuam significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na corrida contra a resistência dos microrganismos patogênicos (OSTROSKY *et al.*, 2008).

O interesse em encontrar agentes antimicrobianos naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico aumentou consideravelmente a partir do início dos anos 80, em virtude do surgimento de resistências bacterianas (DEGÁSPARI *et al.*, 2005). Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos das plantas, incluem: terpenóides, alcalóides, compostos fenólicos (fenóis simples, flavonóides e taninos), quinonas, e cumarinas (COUTINHO *et al.*, 2004).

Os compostos fenólicos apresentam ação sobre os microrganismos provocando a privação de substrato e a ruptura da membrana plasmática. Como exemplo de compostos que apresentam tais atividades podem ser citados os fenóis simples, como o catecol, a epicatequina e o ácido cinâmico. Também se incluem neste grupo, as cumarinas, formadas pela união de um benzeno com um anel α -pirona (COWAN, 1999). Estudos a respeito das cumarinas demonstraram inibição *in vitro* de *Candida albicans* (THORNES, 1997) e o

estímulo de macrófagos, que apresentam efeito negativo indireto sobre as infecções (CASLEY-SMITH e CASLEY-SMITH, 1997).

Os taninos, polifenóis de alto peso molecular, têm recebido destacadada atenção nos anos recentes, uma vez que o consumo de bebidas que contêm estes compostos tem sido associado à cura e prevenção de várias doenças (COWAN, 1999). Os taninos agem sobre os microrganismos por meio de ligação com proteínas e adesinas (proteínas e polissacarídeos da parede celular dos microrganismos), inibição de enzimas, ruptura da membrana plasmática e privação do substrato microbiano (HASLAM, 1996).

Um outro grupo de polifenóis, os flavonóides, se ligam a adesinas e formam complexos com a parede celular das bactérias. De forma semelhante atuam as quinonas, como a hipericina, que são altamente reativas e encontradas de forma ubíqua na natureza (FALKENBERG, 1999; COWAN, 1999).

Entre os chamados óleos essenciais destaca-se a artemisina (sesquiterpeno), conhecida por suas propriedades anti-malária (VISHWAKARMA, 1990). Além disso, é vasta a quantidade de literatura que relata a ação dos óleos essenciais contra bactérias, fungos, vírus e protozoários (GHOSHAL *et al.*, 1996; HABTEMARIAM *et al.*, 1993; HARRIGAN *et al.*, 1993).

Por fim, a berberina, um representante do grupo dos alcalóides, apresenta ação efetiva contra tripanossomos e plasmódios (COWAN, 1999). O mecanismo de ação destes compostos é atribuído à sua habilidade de se intercalar com o DNA desses protozoários (PHILLIPSON e O'NEILL, 1987).

Tendo em vista que algumas classes de substâncias com propriedades farmacológicas já foram isoladas de plantas da família Myrtaceae e a notável abundância de óleos essenciais e taninos em órgãos vegetativos e reprodutivos de plantas dessa família, o primeiro capítulo deste trabalho teve como objetivo realizar uma avaliação das frações semipuras do extrato das folhas de *Psidium guineense* quanto ao seu potencial antibacteriano. Por meio dessa avaliação preliminar, pretendeu-se avaliar a possibilidade dos taninos estarem entre as classes de substâncias envolvidas com a atividade antibacteriana apresentada pela planta.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Coleta do material botânico

Folhas de *Psidium guineense* foram coletadas aleatoriamente de 10 indivíduos, no município de Glauçilândia, localizado ao norte do estado de Minas Gerais (coordenadas 16°51'00"S e 43°41'49"W), no mês de Agosto de 2008. O ambiente de coleta (Figura 1) caracteriza-se por apresentar vegetação de pequeno porte, constituída, principalmente, por pequenos arbustos expostos a uma alta incidência luminosa. A maior parte das folhas coletadas era jovem, uma vez que a coleta foi realizada logo após o período de queda das folhas.



Figura 1: Mapa do local de coleta das folhas de *Psidium guineense* (indicado por seta). Acima: em destaque um dos indivíduos de *Psidium guineense* no local de coleta.

Exemplares do material botânico coletado foram preparados de acordo com as técnicas convencionais de identificação e herborização (FIDALGO e BONONI, 1984) e depositados no Herbário Montes Claros da Universidade Estadual de Montes Claros (Minas Gerais) com o número de registro 606. O material botânico coletado foi transportado em sacos plásticos para o Laboratório de Métodos Analíticos em Biologia, da Universidade Estadual de Montes Claros, para realização das análises.

3.2.2 Extração

O método usado para extrair compostos oriundos do metabolismo secundário das plantas foi planejado com cuidado, uma vez que todos os resultados das análises poderiam ser

afetados pelos passos da extração. Sendo assim, este trabalho propôs a realização de dois tipos de tratamento pré-extração das amostras, a fim de se avaliar a influência de cada método nos resultados dos testes realizados. Quantidades iguais de folhas coletadas de cada indivíduo foram misturadas na extração. Os procedimentos de extração e semipurificação foram realizados em triplicata.

3.2.2.1 Tratamento pré-extração 1

O tecido fresco coletado foi cortado em pequenos pedaços, de aproximadamente 15 mm, com tesoura e colocado em almofariz com nitrogênio líquido. O material foi moído com pistilo até formar um pó fino e este, por sua vez, foi mantido congelado a -18°C, em ambiente escuro, até o momento da extração.

3.2.2.2 Tratamento pré-extração 2

O material coletado foi seco em estufa de circulação de ar a 40° C, pulverizado em moinho tipo Willey, e mantido em ambiente escuro, a -18°C, até o momento da extração.

3.2.2.3 Preparação do Extrato Metanólico Bruto

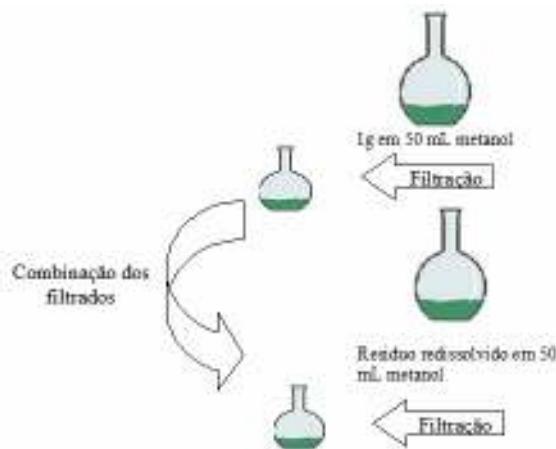


Figura 2: Esquema de preparação do Extrato Metanólico Bruto

Como ilustrado na Figura 2, 1g de massa seca das amostras oriundas de cada tratamento pré-extração foram misturadas, separadamente, com 50 mL de metanol. As misturas foram armazenadas em local escuro por 12 horas, sob agitação constante, à

temperatura ambiente. Após filtração com papel de filtro (Wathman, 125 mm), o processo foi repetido com os resíduos por mais 12 horas pela adição de 50 mL de metanol, e os filtrados foram armazenados em refrigerador (4°C). Os filtrados das duas extrações foram combinados e o solvente totalmente evaporado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida a 40°C.

3.2.3 Semipurificação do Extrato Metanólico Bruto

Cada Extrato Metanólico Bruto (EMB), obtido dos dois tipos de material vegetal (seco e fresco), foi diluído em 40 mL de água destilada/etanol (4:1, v/v) e então filtrado em papel de filtro (Wathman, 125 mm). Os filtrados foram submetidos a uma semipurificação com emprego de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente: éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e n-butanol (Figura 3). Três extrações seqüenciais com 20 mL de cada solvente foram realizadas. As frações orgânicas obtidas foram então desidratadas com sulfato de sódio anidro por 30 minutos para remover os resíduos de água. Subseqüentemente essas frações foram filtradas e os solventes totalmente evaporados em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, a 40°C.

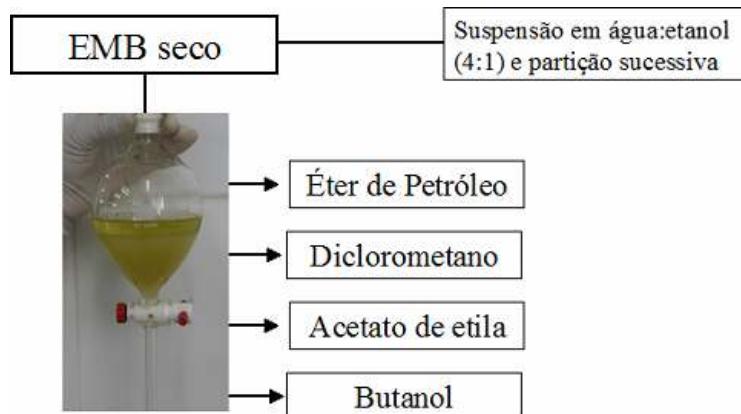


Figura 3: Esquema de semipurificação do Extrato Metanólico Bruto (EMB)

3.2.4 Determinação do rendimento do extrato bruto e das frações

Para determinação do rendimento do extrato bruto obtido, dividiu-se a massa final do extrato seco, em gramas, pela massa inicial do material vegetal utilizado na extração (massa seca), em gramas. O resultado da divisão foi multiplicado por 100.

Para determinação do rendimento das frações dividiu-se a massa em gramas de cada fração seca pela massa de extrato seco utilizado no fracionamento, e multiplicou-se o resultado por 100.

3.2.5 Atividade Antibacteriana

Os testes de inibição do crescimento bacteriano foram realizados com as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Cepas padrão semeadas em ágar BHI-Infuso-cérebro-coração (Biobrás) com óleo mineral (Ideal) foram repicadas em ágar Müller-Hinton (Biobrás), e incubadas por 24 horas, em estufa a 35 °C. A partir de culturas recentes, foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina NaCl 0,98% com turvação equivalente a Escala de McFarland 0,5 (1×10^8 células/mL) (National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS 2003). Os testes de atividade antibacteriana foram realizados em triplicata.

3.2.5.1 Difusão em ágar - Variante Poço

As suspensões bacterianas foram semeadas com auxílio de *swab* estéril em placas de petri contendo 70 mL de ágar Müller-Hinton. A perfuração dos poços no meio sólido foi realizada com auxílio de cilindro de 6 mm de diâmetro.

Os resíduos finais de cada semipurificação, para os dois tratamentos pré-extracção, foram dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO) (99,9% VETEC), de modo que se obtivesse uma concentração final de 40 mg/mL. O extrato metanólico bruto, obtido por meio das duas extrações consecutivas de 12 horas, também foi testado com a mesma concentração de 40 mg/mL.

A cada poço foram adicionados 50 µL de amostra dissolvida (frações e extrato bruto). Foram utilizados 50 µL de DMSO como controle negativo. Como controle positivo, utilizou-se 50 µL de solução de tetraciclina a 0,6 mg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* e a mesma concentração de cloranfenicol para *Staphylococcus aureus*. As placas foram incubadas em estufa, por 18 h, a 35 °C. Após a incubação, foram medidos, em milímetros, os diâmetros dos halos de inibição formados ao redor dos orifícios (VALGAS *et al.*, 2007).

3.2.5.2 Difusão em Ágar - Variante Disco

As suspensões dos microrganismos-teste foram semeadas com o auxílio de *swab* estéril em placas de Petri que continham ágar Müller-Hinton. O teste de difusão em disco foi baseado na Norma M2-A8 do NCCLS 2003.

Os resíduos finais de cada semipurificação, para os dois tratamentos pré-extração, foram dissolvidos em DMSO, de modo que se obtivesse uma concentração final de 200 mg/mL. O extrato metanólico bruto, obtido por meio de duas extrações consecutivas de 12 horas, também foi testado com a mesma concentração de 200 mg/mL.

Foram utilizados discos Blank estéreis de 6 mm de diâmetro (Cecon), embebidos com 10 µL de amostra. As placas foram incubadas, a 35°C, durante 18 horas. Após a incubação, realizou-se a medida do halo de inibição formado em torno dos discos, em milímetros. Discos comerciais de cloranfenicol 30µg (Laborclin) foram utilizados como controle positivo para *S. aureus*. Para *P. aeruginosa* utilizou-se discos de tetraciclina 30µg (Laborclin). Discos impregnados com 10 µL de DMSO foram usados como controle negativo.

3.2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados no sistema estatístico R, Versão 2.8.0 (R-CORE, 2008), com utilização de modelos lineares generalizados. O modelo adequado foi estimado a partir da eliminação de variáveis não significativas testadas a partir do modelo completo, método backward (CRAWLEY, 2005). Foi usada análise de variância (ANOVA) para examinar cada uma das variáveis explicativas (frações semipuras e extrato bruto, método de difusão, material vegetal, cepas testadas e interações duplas entre as variáveis) em relação a variável resposta (halo de inibição).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Extração e semipurificação do extrato bruto

O Extrato Metanólico Bruto oriundo do material Seco (EMBS) apresentou maior rendimento ($33,89\% \pm 1,92$) que o extrato oriundo do material Fresco (EMBF) ($25,51\% \pm 1,92$) (ANOVA, $P=0,03673$). Esse fato, provavelmente se deve a maior eficiência na pulverização das folhas do processo de moagem em relação à maceração com nitrogênio líquido, o que resultou numa maior superfície de contato do material seco com o solvente utilizado na extração. Rendimentos semelhantes a estes foram obtidos por PANSERA *et al.* (2003) para várias espécies de plantas medicinais, com período de extração e proporção solvente/material vegetal superiores às condições utilizadas neste trabalho.

O rendimento das frações obtidas a partir de cada Extrato Metanólico Bruto (EMB) é mostrado na Tabela 1:

Tabela 1: Rendimento das frações (Éter de Petróleo, Diclorometano, Acetato de Etila, n-Butanol e Aquosa) obtidas a partir do Extrato Metanólico Bruto obtido de material seco (EMBS) e de material fresco (EMBF).

Origem da Fração	Rendimento das Frações (%)						Total (%)
	Éter Petróleo	Diclorometano	Acetato Etila	n-Butanol	Aquosa		
EMBS	16	13	14	40	15		98
EMBF	21	06	15	38	18		98

A fração de maior rendimento foi a butanolica (de maior polaridade) e a de menor rendimento foi a de diclorometano. Estes resultados demonstram que grande parte dos compostos presentes no extrato de *P. guineense* possui natureza polar. O fracionamento do extrato bruto com solventes de polaridade crescente permite inferir as possíveis classes de substâncias extraídas nas diferentes frações de acordo com suas polaridades. Segundo CECHINEL FILHO e YUNES (1998), esteróides e terpenos são os prováveis compostos extraídos pelo hexano, enquanto diclorometano extrai lignanas, flavonóides, sesquiterpenos, triterpenos e cumarinas. Acetato de etila extrai flavonóides, taninos, saponinas e compostos fenólicos em geral; e o butanol extrai flavonóides, taninos e saponinas.

Avaliações preliminares, em que o hexano foi utilizado como solvente em vez de éter de Petróleo, mostraram um rendimento maior da fração de diclorometano. Entretanto, dificuldades encontradas na separação da fase orgânica levaram a substituição do hexano para

o éter de petróleo, o que facilitou sobremodo a separação da fração diclorometânica. Diante disso, pode-se inferir que o éter de petróleo extraí uma maior gama de compostos que o hexano, diminuindo a disponibilidade de compostos que o diclorometano poderia extraír e assim, facilitando as separações subsequentes. Na avaliação do potencial antioxidante de *Psidium guajava*, realizada por IHA *et al.* (2008), foram utilizados somente os solventes: diclorometano, acetato de etila e butanol.

A fração aquosa identificada na Tabela 1 se refere ao que sobrou das extrações seriais; e o rendimento apresentado por esta fração demonstra que uma parte dos metabólitos não foi extraída por nenhum dos solventes utilizados nesse processo de semipurificação.

3.3.2 Atividade antibacteriana

Os resultados dos testes antibacterianos de difusão em ágar com *Pseudomonas aeruginosa*, expressos por meio da medida do diâmetro dos halos de inibição do extrato bruto (EMB), das frações e dos controles encontram-se na Figura 4 e estão ilustrados na Figura 6.

De modo geral, o Extrato Metanólico Bruto (EMB) e as frações de acetato de etila e n-butanol inibiram o crescimento de *P. aeruginosa*. Entretanto, as frações de éter de petróleo e diclorometano não formaram halo de inibição (Figura 4). O EMB e a fração butanólica apresentaram maior halo de inibição que o padrão tetraciclina. Esse resultado já era esperado, uma vez que *P. aeruginosa* é um organismo que apresenta resistência intermediária a esse antibiótico, o qual foi utilizado neste experimento devido à indisponibilidade de um outro antimicrobiano que seja eficaz na inibição do crescimento dessa bactéria.

O resultado da análise de variância, entre os tipos de materiais vegetais utilizados nos testes, demonstrou que não houve diferença entre os halos de inibição formados pelos dois tipos de material vegetal utilizado (seco e fresco) (ANOVA, $P= 0,06002$), tanto para *P.aeruginosa* quanto para *S. aureus*.

Não houve diferença entre os halos formados pela tetraciclina, tanto em relação ao material vegetal, quanto ao método de difusão (Figura 4). Quanto ao material vegetal (fresco e seco), já se esperava que o diâmetro do halo desse antibiótico não variasse, uma vez que não havia qualquer diferença entre os antibióticos usados como controle nesse teste. O controle negativo (Dimetilsulfóxido) não apresentou halo de inibição em nenhum dos testes realizados (Figura 4).

A fração de acetato de etila apresentou maior sensibilidade à variante poço do método de difusão em ágar, para ambos os tipos de material vegetal (Figura 4A e 4B). Já a fração

butanólica apresentou maior halo de inibição com a variante disco, somente com o material fresco (Figura 4A). O EMB também apresentou maior halo de inibição com a variante disco, mas somente com o material vegetal seco (Figura 4B).

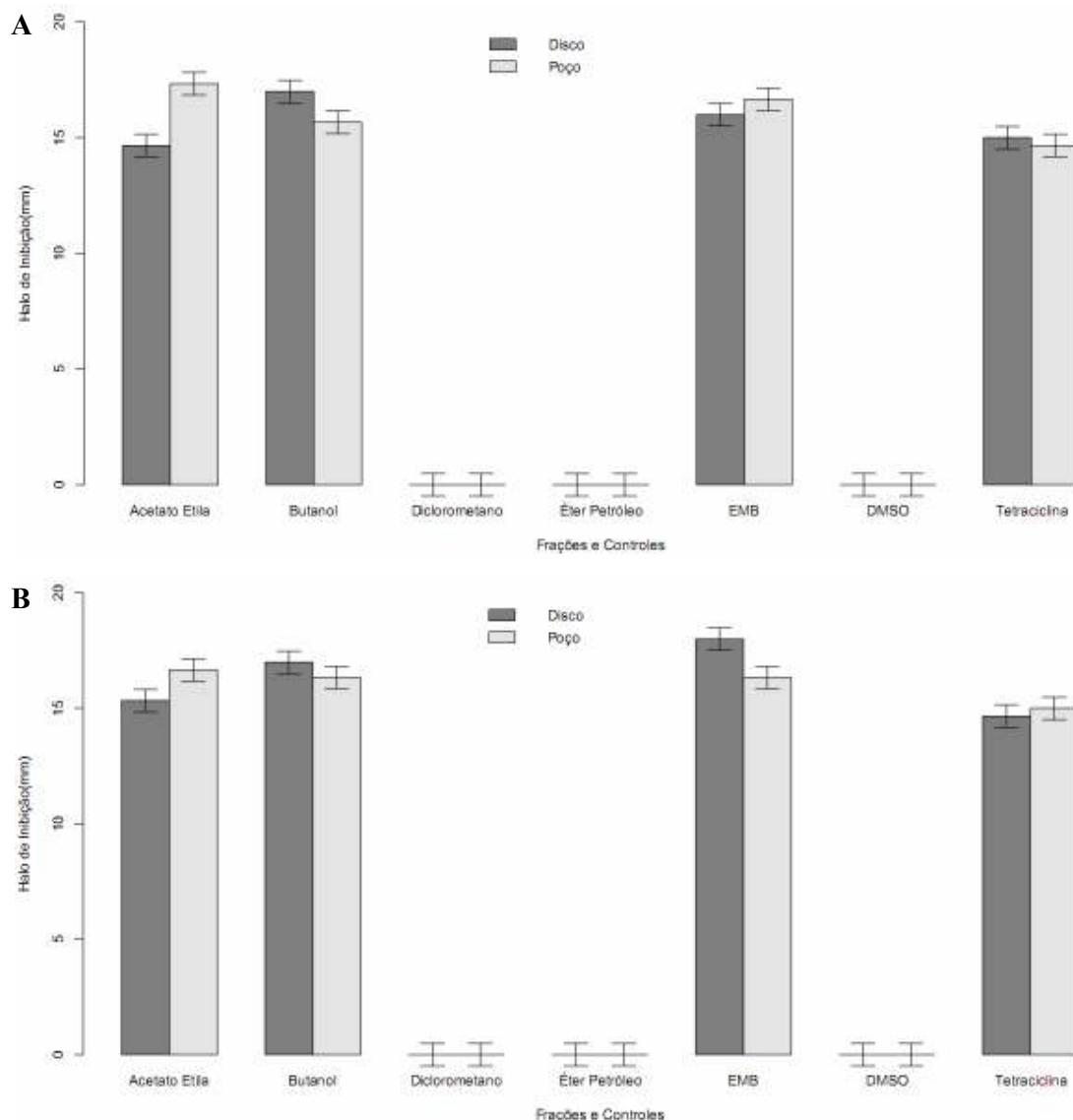
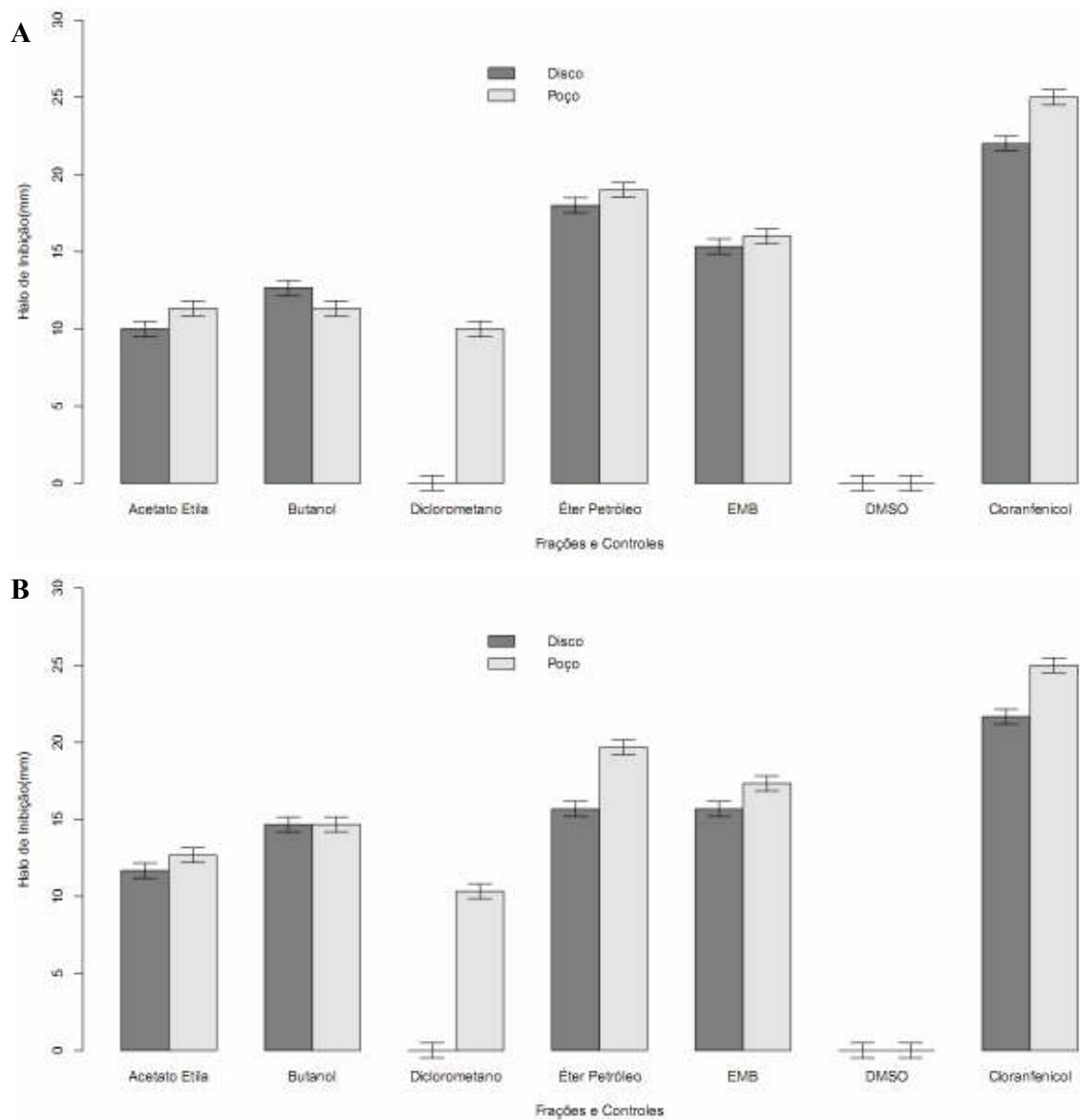


Figura 4: Medidas do diâmetro do halo de inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em função das frações semipuras e dos controles positivo (tetraciclina) e negativo (DMSO). (A) *P. aeruginosa* + material vegetal fresco; (B) *P. aeruginosa* + material vegetal seco.

Os resultados dos testes antibacterianos de difusão em ágar com *Staphylococcus aureus*, expressos por meio da medida do diâmetro dos halos de inibição do extrato bruto (EMB), das frações e dos controles são apresentados na Figura 5 e ilustrados na Figura 6.



De modo geral, todas as frações formaram halo de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* (Figura 5). Esse resultado sugere que mais de uma substância seja responsável pela inibição do crescimento de *S.aureus* no extrato de *P.guineense*, podendo haver, inclusive, sinergismo na atuação dessas substâncias. Isso pode explicar a alta resistência a doenças e pragas, apresentada por essa espécie de planta (RASEIRA e RASEIRA, 1994). Entretanto nenhuma fração forneceu medida de halo de inibição igual ou maior ao do controle positivo.

O controle positivo, cloranfenicol, apresentou inibição conforme esperado, frente ao *S.aureus*. Diferente da tetraciclina, usada no teste com *P. aeruginosa*, o cloranfenicol apresentou diferença nos diâmetros dos halos de inibição entre as variantes disco e poço. O controle negativo, DMSO, não apresentou halo de inibição em nenhum dos testes realizados.

A fração de éter de petróleo foi a que apresentou maior atividade (Figura 5A e 5B) contra *S. aureus*, inclusive maior que o extrato bruto (EMB). Isso ocorreu provavelmente porque a fração, apesar de ainda apresentar-se complexa em relação à pureza dos materiais que contém, possui uma gama de compostos menor que o extrato bruto, reduzindo assim as variáveis que poderiam afetar a capacidade de difusão dos compostos antimicrobianos no meio de cultura. Observa-se ainda que a fração de éter de petróleo apresentou melhor difusão em poço.

Com o material vegetal fresco, a fração de acetato de etila apresentou maior sensibilidade a variante poço, enquanto na fração butanólica a variante disco apresentou maior halo (Figura 5). Quanto à fração de diclorometano, não se observou formação de halo na variante disco; e mesmo na variante poço, o diâmetro do halo formado foi muito pequeno (10 mm).

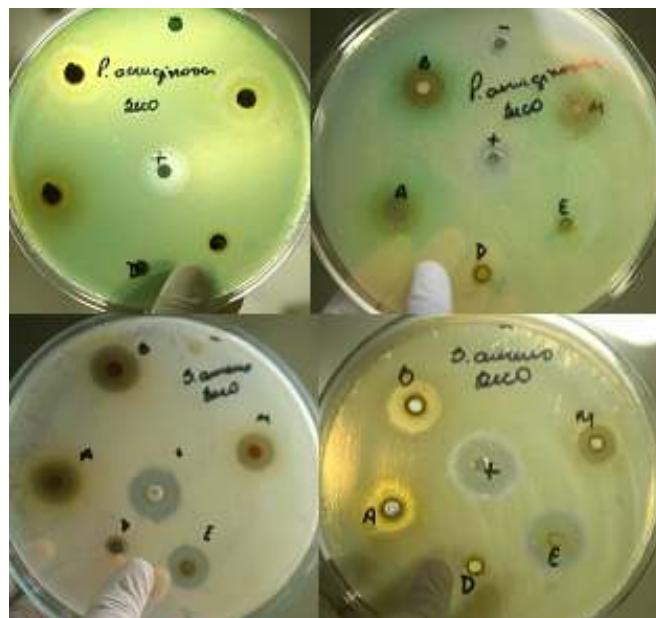


Figura 6: Testes antibacterianos de difusão em ágar, variante disco (esquerda) e variante poço (direita), realizados com *Pseudomonas aeruginosa* (acima) e *Staphylococcus aureus* (abaixo), em que foram utilizados extrato bruto e frações, oriundos do material vegetal seco de *P. guineense*. Nas quatro ilustrações, no sentido horário tem-se: (-) = controle negativo; M = EMB; E = éter de petróleo; D = dicloromentano; A = acetato de etila; B = butanol; e no meio (+) = controle positivo.

Observa-se, tanto nos testes realizados com *P.aeruginosa* quanto com *S.aureus*, uma tendência dos compostos presentes nas frações (de natureza apolar) de éter de petróleo e

diclorometano se difundirem melhor em poços. Entretanto, como as frações trabalhadas apresentam-se ainda bastante complexas, contendo várias classes de compostos, pode ser precipitada a afirmação de que a variante poço do método de difusão em ágar apresente maior sensibilidade para os compostos apolares, pois a fração de acetato de etila, que possui compostos com polaridade relativamente maior, também difundiu melhor em poço.

Testes antimicrobianos com extratos, frações e compostos puros, realizados por VALGAS *et al.* (2007), apontaram argumentos a favor do uso preferencial da variante poço na triagem de produtos naturais com atividade antibacteriana. Segundo os autores, na variante poço, a presença de matéria suspensa na amostra a ser testada apresenta menor interferência com a difusão da substância antimicrobiana em ágar que no disco de papel.

No teste de difusão em ágar, em geral, ocorre a formação de um gradiente de concentrações da substância antimicrobiana, uma vez que o agente antimicrobiano difunde radialmente no meio de cultura. A concentração da droga diminui com o aumento da distância do disco ou poço. Em um ponto crítico, a quantidade da droga em um local específico no meio é incapaz de inibir o crescimento do organismo teste, e uma zona de inibição é formada. A maior vantagem da variante disco em relação ao poço é a sua padronização e por seu desempenho ser continuamente atualizado pelo NCCLS (MAHON e MANUSELIS JR, 1995), diferente da variante poço que consiste em um processo mais artesanal.

As variações na atividade antimicrobiana apresentada por extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles é possível citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada (OSTROSKY *et al.*, 2008). No presente trabalho, observou-se que a técnica aplicada e o microrganismo utilizado no teste realmente influenciaram nos resultados dos testes antibacterianos; mas o mesmo não foi observado com o tipo de material vegetal utilizado na preparação dos extratos.

Mas independente de variações, todas as frações de *P. guineense* apresentaram atividade antibacteriana. O resultado sugere que mais de uma substância presente no extrato dessa planta inibe o crescimento bacteriano. Esses resultados demonstram um grande potencial de *P. guineense* como fonte promissora de substâncias com propriedades antibacterianas. Ao avaliar a atividade antibacteriana de *Psidium guineense* frente a *Streptococcus mutans*, GONZÁLEZ *et al.* (2005) comprovaram as potencialidades antibacterianas do extrato bruto e das frações de éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e aquosa da casca e da polpa do fruto dessa espécie.

Estudos realizados com *Psidium guajava* (goiabeira) e *Eugenia uniflora* (pitangueira), ambas pertencentes à família Myrtaceae, demonstraram que extratos das folhas dessas plantas apresentam várias atividades farmacológicas, tais como antiinflamatória, antimicrobiana, antimalárica, hipoglicemiante, antiespasmódica e antioxidante (GUTIÉRREZ *et al.*, 2008; SHAPOVAL *et al.*, 1994). *Psidium guajava*, a espécie mais estudada e conhecida do gênero *Psidium*, demonstrou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* em seus frutos (IHA *et al.*, 2008) e contra várias leveduras do gênero *Candida*, nas folhas (ALVES *et al.*, 2006). Extratos hidroalcoólicos de folhas e caules de *Psidium guajava* inibiram o crescimento de 10 bactérias gram-negativas, entre elas *Salmonella* spp. e *Proteus* spp. (CARVALHO *et al.*, 2002).

GONÇALVES *et al.* (2005) demonstraram alta atividade antibacteriana de *Eugenia uniflora* contra *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Providencia* spp., *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. coagulase negativo. HOLETZ *et al.* (2002) demonstraram a atividade de *Eugenia uniflora* contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*.

A atividade antimicrobiana exibida por essas plantas da família Myrtaceae está relacionada ao seu alto conteúdo de óleos essenciais e compostos fenólicos, como os taninos (GUTIÉRREZ, 2008; ALVES *et al.*, 2006). O fato de frações do extrato de *P.guineense* com polaridades maiores, como o butanol, ou mesmo o acetato de etila, apresentarem atividade antibacteriana permite sugerir que compostos polares como os taninos, podem estar envolvidos nessa capacidade de inibição do crescimento bacteriano, exibida pela planta.

3.4. Conclusões

As frações obtidas por meio de lavagens sucessivas do extrato metanólico das folhas de *Psidium guineense* com éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e n-butanol, apresentam atividade antibacteriana. Portanto, em tal extrato deve haver mais de uma substância ativa contra bactérias. O crescimento de *Staphylococcus aureus* é inibido principalmente por compostos de natureza apolar presentes na fração de éter de petróleo. Já contra *Pseudomonas aeruginosa*, somente as frações de acetato de etila e butanol, que possuem compostos de natureza mais polar, apresentam atividade inibitória. O tipo de material vegetal (seco ou fresco), utilizado na extração dos compostos que inibem o crescimento das duas cepas, não afeta o diâmetro do halo de inibição. Quanto ao método de difusão em ágar, os resultados obtidos não permitem afirmar uma tendência de difusão dos compostos de acordo com sua polaridade, tendo em vista a complexidades das amostras trabalhadas. Independente de variações nos métodos, todas as frações de *P. guineense* apresentam atividade antibacteriana, demonstrando as potencialidades dessa espécie quanto ao fornecimento de moléculas com propriedades antibacterianas. O fato de frações com polaridades maiores também apresentarem atividade antibacteriana permite sugerir que compostos polares como os taninos, podem estar entre as substâncias presentes na planta que apresentam esse potencial.

Referências Bibliográficas

- ALVES, P.M.; LEITE, P.H.A.S.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, L.F., PEREIRA, M.S.V.; HIGINO, J.S.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 2, p. 192-196, 2006.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Manual de Microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. 2 ed. Salvador, 2004. Disponível em : <<http://www.anvisa.gov.br/servicosaud/microbiologia/introducao.pdf>> Acesso em: 20 set. 2008.
- BARROS, E. J.G ; BITTENCOURT, H.; BRUNSTEIN, C.; CARAMORI, M.; MACHADO, A. **Antimicrobianos**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. 428p.
- CARVALHO, A.A.T.; SAMPAIO, M.C.C.; SAMPAIO, F.C.; MELO, A.F.M.; SENA, K.X.F.R.; CHIAPPETA, A.A.; HIGINO, J.S. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram-negativas. **Acta Farmacêutica Bonarense**. v. 21, n. 4, p. 255-258, 2002.
- CASLEY-SMITH, J.R. e CASLEY-SMITH J. R. Coumarin in the treatment of lymphoedema and other high-protein oedemas. In: O'KENNEDY, R. e THORNES, R.D. (ed.). **Coumarins: biology, applications and mode of action**. New York: John Wiley & Sons, 1997. 348p.
- CECHINEL FILHO, V. e YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**. v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- COUTINHO, H.D.M.; BEZERRA, D.A.C.; LÔBO, K.; BARBOSA, I.J.F. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Conceitos**. p. 78-85, 2004.
- COUTO, R.C., PEDROSA T.M.G. Infecções hospitalares no Brasil e no Mundo. In: COUTO, R.C.; PEDROSA, T.M.G.; NOGUEIRA, J.M. (org.) **Infecção Hospitalar: Epidemiologia e Controle**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. p. 3-4.
- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.
- CRAWLEY, M.J. **Statistical: An introduction using R**. New York: Jhon Wiley e Sons, 2005. 761p.
- DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 29, v. 3, p. 617-622. 2005.
- FALKENBERG, M.B. Quinonas In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOMES, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, A. e PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora UFRGS. 1999. p. 657-683.

FIDALGO, O.; BONONI, V.L.R. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1984. 62p.

GHOSHAL, S.; PRASAD, B.N.K.; LAKSHMI, V. Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 50, p. 167–170, 1996.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 72, n.3, p. 353-358, 2005.

GONZÁLEZ, A.M.N.; GONZÁLEZ, M.B.R.; PINTO, N.L.S. Phytochemical study and antibacterial activity of *Psidium guineense* Sw (choba) against *Streptococcus mutans*, causal agent of dental caries. **Revista Cubana Plantas Medicinais**. v. 10, n. 3-4, p. 0-0, 2005. Disponível em: <http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol10_3-4_05/pla083-405.pdf> Acesso em: 10 mar. 2008.

GOODMAN, L.S. e GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9 ed. . Rio de Janeiro: MacGraw-Hill Interamericana, 1996. 1848p.

GUTIÉRREZ, R.M.P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phiochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 117, p. 1-27, 2008.

HABTEMARIAM, S.; GRAY, A.I.; WATERMAN, P.G. A new antibacterial Sesquiterpene from *Premna oligotricha*. **Journal of Natural Products**. v. 56, p. 140–143, 1993.

HARRIGAN, G. G.; AHMAD, A.; BAJ, N.; GLASS, T.E.; GUNATILAKA, A.A.L.; KINGSTON, D.G.I. Bioactive and other sesquiterpenoids from *Porella cordeana*. **Journal of Natural Products**. v. 56, p. 921–925, 1993.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**. v. 59, p. 205–215, 1996.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMIRA, G.V.. DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infections diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

IHA, S.M.; MIGLIATO, K.F.; VELLOSA, J.C.R.; SACRAMENTO, L.V.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B.; BRUNETTI, I.L.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial oxidante para o desenvolvimento de formulação cosmética. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 3, p. 387-393, 2008.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.; ADELBERG, E. **Microbiologia médica**. 5. ed. Rio de janeiro: Guanabara, 1968. 568p.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi. 2001. 527p.

MAHON, C.R.; MANUSELIS JR, G. **Textbook of Diagnostic Microbiology**. Editora W.B. Saunders. 1995. 1134p.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). . **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão**: Norma Aprovada. 8 ed. Copyright, n. 1, v. 23, 2003. 58p.

OSTROSKY, E.A.; MYZUMOTO, M.R.; LIMA, M.E.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PANSERA, M.R.; SANTOS, A.C.A.; PAESE, K. WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L.D.; PAULETTI, G.F.; SERAFINI, L.A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 13, n. 1, p. 17-22, 2003.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M.C.; MUÑOZ, J.D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 77, p. 37-40, 2001.

PEREIRA, A.C. **Purificação e caracterização de antibacterianos de plantas do Município de Lavras**. 2006. 206f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

PHILLIPSON, J. D. e O'NEILL, M. J. New leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. **Acta pharmaceutica Nordica**. v. 1, p. 131–144, 1987.

RASEIRA, A.; RASEIRA, M.C.B. “Ya - cy”, Cultivar de araçazeiro lançada pela EMBRAPA / CPACT. **Hirti Sul**, Pelotas, v.3, n.1, p.37-39, 1994.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>> Acesso em: 05 set. 2008.

SCHAPOVAL, E.E.S.; SILVEIRA, S.M.; MIRANDA, M.L.; ALICE, C.B.; HENRIQUES, A.T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 44, n. 3, p. 137-142, 1994.

STRATTON, C.W. Nuances in antimicrobial susceptibility testing for resistant gram-positive organisms. **Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter**. v. 18, p. 57-64, 2000.

THORNES, R.D. Clinical and biological observations associated with coumarins. In: R. O'Kennedy, R. e THORNES, R.D. (ed.). **Coumarins: biology, applications and mode of action**. New York: John Wiley & Sons, 1997. 256p.

TRABULSI, L.R.; TEIXEIRA, L.M. e BUERIS, V. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. e MARTINEZ, M. B. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

VALGAS, C.; SOUZA, S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JR A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 369-380, 2007.

VISHWAKARMA, R. A. Stereoselective synthesis of a-arteether from artemisinin. **Journal of Natural Products**. v. 53, p. 216–217, 1990.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida?. **Boletim de saúde**. v.1, n. 4, p. 1-6, 2004.

4 CAPÍTULO 2 - Isolamento, quantificação e avaliação da atividade antibacteriana de taninos de *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae)

4.1 Introdução

O termo tanino foi o nome dado à infusão de cascas de árvores, como o carvalho e a castanheira, com a qual as peles dos animais eram tratadas para obtenção de couros maleáveis e de grande durabilidade. A capacidade de curtir couros deve-se a habilidade destes compostos em combinar-se às moléculas de colágeno da pele dos animais, aumentando sua resistência ao calor, à água e aos microrganismos (QUEIROZ *et al.*, 2002; MONTEIRO *et al.*, 2005).

A definição dos taninos tem sido historicamente associada a sua habilidade de precipitar proteínas (ZUCKER, 1983). Apesar de apresentarem uso extensivo e longamente estabelecido, a definição exata desses constituintes vegetais não é simples. Bate-Smith e Swain, em 1962, definiram os taninos como "compostos fenólicos solúveis em água, com peso molecular entre 500 e 3.000 Daltons e que, por meio de reações fenólicas usuais, têm a propriedade de precipitar alcaloides, gelatinas e outras proteínas". Entretanto, essa definição não inclui todos os tipos de taninos, uma vez que, mais recentemente, moléculas com massa molar acima de 20000 Daltons foram isoladas (KHANBABAE e REE , 2001).

De uma forma mais simples, pode-se dizer que os taninos são substâncias com sabor adstringente, que apresentam a capacidade de curtir o couro. Tais compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glicoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante da mucosa bucal (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Tradicionalmente os taninos são classificados em condensados e hidrolisáveis. Os taninos condensados, formados pela polimerização de unidades de flavonóides, podem freqüentemente ser hidrolisados a antocianidinas por tratamento com ácidos fortes, e por isso, são também denominados proantocianidinas. Os taninos hidrolisáveis são polímeros heterogêneos que contêm ácido gálico e açúcares simples. Eles são menores que os taninos condensados, e podem ser hidrolisados mais facilmente, sendo necessário somente ácido diluído (SANTOS e MELLO, 1999).

Os taninos hidrolisáveis, formados a partir da via Chiquimato (MONTEIRO *et al.*, 2005), são caracterizados por um poliol central, geralmente β -D- glicose, cujas hidroxilas são esterificadas com ácido gálico (Figura 7) (SANTOS e MELLO, 1999). Essa classe de taninos

é dividida em dois grupos, os galotaninos e os elagitaninos. Os galotaninos, relativamente raros na natureza, resultam da união entre unidades de ácido gálico via ligações denominadas *meta*-depsídicas (MUELLER-HARVEY, 2001). Os elagitaninos possuem um ou dois resíduos de hexa-hidróxi-difenoil-*D*-glicose (HHDP) de configuração (R) ou (S), os quais são obtidos pelo acoplamento oxidativo C-C entre dois resíduos de ácido gálico espacialmente adjacentes. A subdivisão dos taninos hidrolisáveis é usualmente feita com base nos ácidos fenólicos liberados por hidrólise. Os taninos que liberam somente ácido gálico são definidos como galotaninos e aqueles que liberam hexa-hidróxi-difenoil-*D*-glicose (ácido elágico) são chamados elagitaninos (SANTOS e MELLO, 1999).

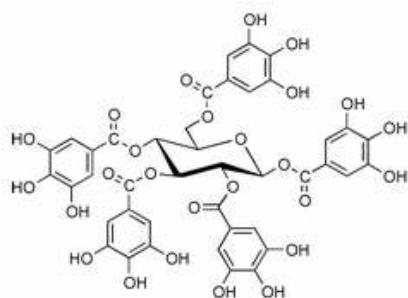


Figura 7: Pentagalloylglucose - Precursor de galotaninos e elagitaninos
Fonte: SANTOS e MELLO (1999)

Largamente encontrados no reino vegetal, os taninos condensados ou proantocianidinas são oligômeros e polímeros formados pela condensação de unidades de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol, produtos do metabolismo do Fenilpropanol (DE BRUYNE *et al.*, 1999a; SCHOFIELD *et al.*, 2001). Esta classe de taninos apresenta uma rica diversidade estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, da diversidade de posições entre suas ligações e da estereoquímica de seus compostos (MONTEIRO *et al.*, 2005). O monômero catequina (Figura 8) tem centros assimétricos nas posições 2 e 3 no anel C. R2 é um grupamento OH, algumas vezes esterificado para ácido gálico. Conforme a presença ou ausência de hidroxila na posição C-5 do anel A de seu monômero, os taninos condensados podem ser divididos em procianidinas e prodelfinidinas. Um aumento na razão prodelfinidina/procianidina em taninos condensados aumenta a habilidade destes compostos formarem complexos com proteínas (SCHOFIELD *et al.*, 2001).

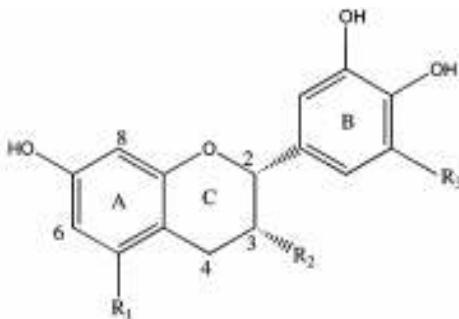


Figura 8: Catequina - monômero básico dos taninos condensados
Fonte: SCHOFIELD *et al.* (2001)

Portanto, a estrutura química apresentada pelos taninos está intimamente relacionada a suas propriedades biológicas. Os múltiplos grupos hidroxi-fenólicos apesentados pelos taninos condensados, por exemplo, levam a formação de complexos com proteínas, com íons metálicos e com outras macromoléculas, como os polissacarídeos (HAGERMAN *et al.*, 1998; (SCALBERT, 1991). Além disso, a presença de ésteres de ácido gálico nestes compostos pode mudar significativamente suas propriedades biológicas (SCHOFIELD *et al.*, 2001).

Por serem fenólicos, os taninos são muito reativos quimicamente. Estes compostos formam pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares e são facilmente oxidáveis, tanto através de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como cloreto férreo, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções. Sua capacidade de fomar complexos com macromoléculas, tais como as proteínas, é a base tanto para suas propriedades ecológicas de controle de insetos, fungos e bactérias quanto para suas atividades farmacológicas (SANTOS e MELLO, 1999).

Os complexos formados entre taninos e proteínas podem ser reversíveis ou irreversíveis. Os reversíveis são estabelecidos via pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, enquanto que os irreversíveis ocorrem em condições oxidativas via ligações covalentes. As pontes de hidrogênio são provavelmente formadas entre as hidroxilas fenólicas dos taninos e os grupamentos amida das proteínas. As interações hidrofóbicas ocorrem entre os núcleos aromáticos dos taninos e as cadeias laterais alifáticas ou aromáticas dos anéis aromáticos protéticos. Os complexos irreversíveis entre taninos e proteínas ocorrem na planta quando seus tecidos são danificados, por auto-oxidação ou oxidação catalisada por enzimas. Em ambos os casos, os fenóis são transformados em quinonas, moléculas eletrofílicas, altamente reativas, que rapidamente reagem com grupos nucleofílicos – NH₂ – e SH das proteínas, formando ligações covalentes (SANTOS e MELLO, 1999). A capacidade dos taninos de se complexarem com as proteínas varia conforme a estrutura química dos taninos

(número de grupos galoil e hidroxilos fenólicas) e das proteínas (conformação e tamanho do polímero) (KAWAMOTO *et al.*, 2006).

A maioria dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares, como álcool e glicerol (SANTOS e MELLO, 1999). Nas plantas, os taninos encontram-se acompanhados de substâncias polifenólicas como os flavonóides, as leucoantocianidinas, as catequinas e os ácidos fenólicos, entre eles os ácidos gálico, ácido clorogênico e outros. Estes compostos, de pesos moleculares relativamente baixos, não são considerados taninos; todavia atribuíram já, a vários deles, o papel de precursores (COSTA, 2002).

Os compostos fenólicos estão ampla e heterogeneamente distribuídos nas plantas vasculares. Enquanto as proantocianidinas ocorrem amplamente em Gymnospermae e Angiospermae, principalmente em plantas lenhosas, os taninos hidrolisáveis estão quase restritos as Choriptalae das dicotiledôneas e não são encontrados nas Simpetalae (SANTOS e MELLO, 1999; DE BRUYNE *et al.*, 1999b). Algumas espécies vegetais produzem galo ou elagitaninos, enquanto outras produzem misturas complexas contendo galo, elagitaninos e taninos condensados (MUELLER-HARVEY, 2001). Entretanto, os taninos elágicos são muito mais frequente que os gálicos (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Os taninos podem apresentar efeitos diversos nas plantas, inclusive contrários, tais como deterrência, estímulo da alimentação, inibição da digestão, estímulo da digestão, toxicidade e regulação do ciclo do nitrogênio. Dessa forma, o tipo e magnitude de seus efeitos variam com a situação e o organismo. Os fenólicos requerem oxidação para a maioria de suas atividades ecológicas; assim a variação na atividade desses compostos resulta da variação das condições oxidativas (APPEL, 1993).

Entretanto os taninos são mais conhecidos por seu papel biológico de defesa química dos vegetais contra o ataque de herbívoros e a infecção por microrganismos patogênicos (SCALBERT, 1991; ZUCKER, 1983). Os taninos são considerados defesa quantitativa das plantas, uma vez que seus efeitos de proteção contra predadores dependem de sua concentração nos tecidos da planta (MILA *et al.*, 1996).

Os taninos, combinados com algumas proteínas presentes em frutos, folhas ou outros órgãos da planta, tornam os tecidos destes órgãos fortemente resistentes a putrefação (MONTEIRO *et al.*, 2005). Folhas com elevado conteúdo de taninos condensados, por exemplo, demonstraram decompor lentamente em ecossistemas aquático e terrestre (HAASE e WANTZEN, 2008).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias, tais como diarréias, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, renais e do sistema urinário, e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996; DE BRUYNE *et al.*, 1999a). Para tratar feridas, queimaduras e inflamações, o poder antisséptico dos taninos pode ser explicado por sua capacidade de precipitar as proteínas das células superficiais das mucosas e dos tecidos, formando uma capa protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada, impedindo, assim, o desenvolvimento de microrganismos (HASLAM, 1996).

Na Ásia, os extratos de plantas ricos em taninos são usados contra diarréia, como diuréticos, contra tumores estomacais e duodenais, como antiinflamatório, antisséptico e hemostático (YOSHIDA *et al.*, 1991). A ingestão de chá verde e de dietas ricas em frutas que contêm taninos tem sido associada com atividade anticarcinogênica (CHUNG *et al.*, 1998).

O conhecimento do papel de defesa das plantas pelos taninos, bem como o uso de plantas ricas nestes compostos na medicina tradicional, têm atraído o interesse científico por essas substâncias, especialmente devido à incidência aumentada de doenças tais como AIDS e vários tipos de câncer. Durante os últimos vinte anos muitos compostos representativos dessa classe de metabólitos têm sido isolados e caracterizados (KHANBABAEE e REE, 2001). Testes biológicos extensivos realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substâncias, tais como ação bactericida e fungicida, antiinflamatória, cicatrizante, antiviral, antitumoral, estimulante de células fagocitária e antidiarréica (MELLO *et al.*, 1996, SCALBERT, 1991; HASLAM, 1996; KHANBABAEE e REE, 2001). Entretanto, ações negativas desses compostos também já foram documentadas, como carcinogenicidade e toxicidade hepática (CHUNG *et al.*, 1998).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas, pelo menos em parte, a três características gerais que são comuns, em maior ou menor grau, aos taninos condensados e hidrolisáveis: 1) complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros); 2) atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres; e 3) habilidade de complexar com macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996; DE BRUYNE *et al.*, 1999b, SCHOFIELD *et al.*, 2001).

Por proteger os vegetais contra infecção microbiana, os taninos podem atuar como agentes antimicrobianos naturais (SCALBERT, 1991; CHUNG *et al.*, 1998). Segundo SANTOS e MELLO (1999), o mecanismo de ação antimicrobiano apresentado por estes compostos envolve inibição de enzimas e/ou a complexação com substratos dessas enzimas, ação sobre as membranas celulares dos microrganismos, e ainda, a complexação com íons

metálicos, diminuindo assim a disponibilidade destes elementos essenciais para o metabolismo dos microrganismos (SANTOS e MELLO, 1999).

O efeito inibitório das diferentes classes de taninos contra vários microrganismos tem sido amplamente estudado e reconhecido. Em 1986, KAKIUCHI *et al.* examinaram vários medicamentos tradicionais chineses para atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e observaram que extratos ricos em galotaninos inibiram a aderência de *S. mutans* a superfícies lisas, devido à ação anti-glicosiltransferase (anti-GTF) desses compostos. Em 1990, HATTORI *et al.* também denotaram uma potente atividade anti-GTF em proantocianidinas. Em 1996, SAKANAKA *et al.* relataram a atuação de polifenóis na inibição do crescimento e aderência celular de bactérias orais *Porphyromonas gingivalis*, responsável pela maioria dos casos de periodontites agudas.

TAKECHI *et al.* (1985) investigaram a relação entre atividade anti-herpética e as estruturas dos taninos. As atividades de taninos hidrolisáveis foram dependentes do número de grupos galoil ou hexahidroxidifenol, enquanto a dos taninos condensados aumentaram com o grau de condensação. KAKIUCHI *et al.* (1991) apontaram os elagitaninos e vários taninos condensados como potenciais inibidores da enzima transcriptase reversa. O efeito inibitório apresentado por estes compostos é devido à prevenção de formação do complexo enzima-ácido nucléico.

KUMAR e VAITHIYANATHAN (1990) propuseram que os taninos inibem diretamente a função microbiana do rúmen, por complexar com o envelope das células bacterianas, ou indiretamente, por reduzir a disponibilidade de nitrogênio e enxofre de proteínas para uso microbiano. Ambos reduzem a taxa de degradação de fibras no rúmen.

CHUNG *et al.* (1998) avaliaram o efeito inibitório de ácido tântico e outros produtos relacionados sobre o crescimento de bactérias isoladas no intestino humano. Ácido tântico, galatopropil e galatometyl (estéres de ácido gálico) inibiram o crescimento de todas as bactérias intestinais (*Bactetroides fragilis*, *Clostridium clostridiiforme*, *C. perfringens*, *C. paraputreficum*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*) testadas, exceto de bactérias do ácido láctico (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium infantis*).

Tendo em vista os resultados obtidos no primeiro capítulo deste trabalho, bem como os vários estudos citados sobre o efeito inibitório dos taninos sobre os microrganismos, o segundo capítulo objetivou isolar, quantificar e avaliar a atividade antibacteriana de taninos de *Psidium guineense*.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Coleta do material botânico

Folhas de *Psidium guineense* (Figura 9) foram coletadas aleatoriamente de 10 indivíduos, no município de Glauçilândia, localizado ao norte do estado de Minas Gerais (coordenadas 16°51'00"S e 43°41'49"W), no mês de Agosto de 2008. A maior parte das folhas coletadas era jovem, uma vez que a coleta foi realizada logo após o período de queda das folhas.



Figura 9: Folhas de *Psidium guineense* coletadas no município de Glauçilândia (norte de Minas Gerais).

O material botânico coletado foi tratado segundo técnicas usuais de identificação e herborização (FIDALGO e BONONI, 1984), depositado no Herbário Montes Claros da Universidade Estadual de Montes Claros com o número de registro 606, e transportado em sacos plásticos para o Laboratório de Métodos Analíticos em Biologia da Universidade Estadual de Montes Claros, para realização das análises.

4.2.2 Isolamento de taninos

Como no capítulo anterior, o material botânico coletado foi submetido a dois tipos de tratamento pré-extracção e todos os procedimentos de extração e isolamento dos taninos foram realizados em triplicata. Quantidades iguais de folhas coletadas de cada indivíduo foram misturadas na extração.

4.2.2.1 Extração

Como esquematizado na Figura 10, vinte gramas de massa seca dos materiais obtidos nos dois tratamentos pré-extração foram suspensos, separadamente, em 100 mL de acetona 70% (contendo 0,1% de ácido ascórbico, para prevenir oxidação) e agitados por 1 hora. Após centrifugação a 11.000 rpm por 10 min, o resíduo insolúvel foi re-extraído quatro vezes com o mesmo solvente, para cada tratamento. Seguiu-se então a evaporação da acetona dos extractos combinados em evaporador rotatório, sob vácuo, a 30°C e eliminação por filtração de ácidos graxos e clorofila que precipitaram na água (SALMINEN *et al*, 1999). Os extractos foram filtrados em uma fina camada de lã de vidro, concentrados em estufa de circulação de ar a 30°C até reduzir o volume ao máximo possível. As amostras concentradas foram diluídas em etanol 95% na proporção 1:1 e centrifugadas a 11.000 rpm para remover materiais insolúveis. Até o momento de sua aplicação na coluna, as amostras foram estocadas em ambiente escuro, a 4°C.

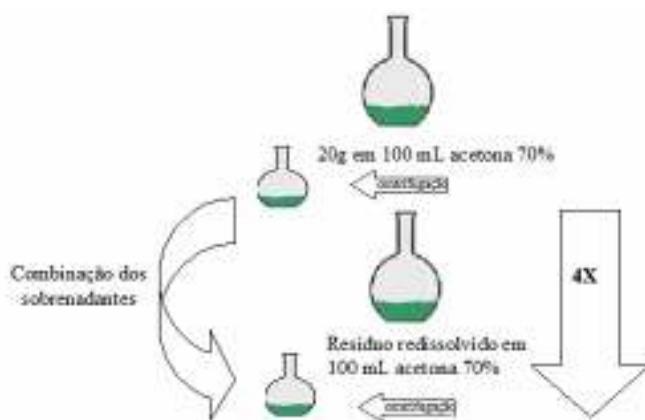


Figura 10: Fluxograma de preparação do extrato bruto (acetona 70%).

4.2.2.2 Método A

Este método foi proposto por Asquith e Butler, em 1985, para isolamento de frações ricas em taninos condensados (HAGERMANN, 2002). Como ilustrado na Figura 11, as amostras aquosas resultantes do processo de extração (de material seco e fresco), dissolvidas em etanol 95%, foram aplicadas, separadamente, a uma coluna de Sephadex LH-20 (3 cm x 30 cm), equilibrada com etanol 95%. O sephadex LH-20 foi lavado com etanol 95% com uma taxa de fluxo de 1mL/min. Frações de 10 ml foram coletadas para leitura de absorbância em 280 nm até que esta ficasse próxima de zero. O etanol usado na lavagem foi descartado, após

cálculo do rendimento das frações reunidas. A coluna foi então eluída com acetona aquosa 50% em uma taxa de fluxo de 1 mL/min até o Sephadex voltar a cor característica (branco) e o eluato tornar-se menos colorido. Frações de 4 mL foram coletadas, e a absorbância em 435 nm foi determinada (WANG e LEE, 1996). Dois mililitros de cada fração foram separados para análise da presença de taninos pelo teste de precipitação de gelatina, como descrito por COSTA (2002). As frações positivas para taninos foram reunidas. A acetona foi completamente removida das frações combinadas por meio de evaporação sob pressão reduzida a 30°C. A amostra aquosa foi extraída três vezes com volume igual de acetato de etila e a fase orgânica (superior) foi descartada. Após a terceira extração, os traços de acetato de etila que permaneceram na fração aquosa foram removidos em estufa de circulação de ar a 30°C. A amostra aquosa foi então congelada e liofilizada, por 72 horas, formando um pó marrom e macio que foi estocado em freezer eletrônico 280 *Frost Free* (-18°C) ao abrigo da luz. A liofilização foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Vacinas da empresa Vallée S.A.. A atividade antibacteriana das frações reunidas foi avaliada. O produto do isolamento foi quantificado pelo método de difusão radial.

4.2.2.3 Método B

Este método foi proposto por Hagerman e Klucher, em 1986, com vistas ao isolamento de misturas ricas em ésteres de ácido gálico e glicose (HAGERMAN, 2002). Como ilustrado na Figura 11, as amostras aquosas, resultantes do processo de extração (do material seco e fresco), dissolvidas em etanol 95% foram aplicadas em coluna de Sephadex LH-20 (40 cm x 3 cm), equilibrada com etanol 95%. O gel de Sephadex foi lavado com etanol 95% em uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min e frações de 10 mL foram coletadas até que a leitura em 280 nm ficasse próxima de zero. O etanol usado na lavagem foi descartado, após cálculo do rendimento das frações reunidas. Os taninos foram então eluídos do gel com acetona 50% contendo ácido ascórbico 0,001M para prevenir oxidação. Frações de 4 mL foram coletadas, e a absorbância em 435 nm foi determinada (WANG e LEE, 1996). Dois mililitros de cada fração foram separados para análise da presença de taninos pelo teste de precipitação de gelatina, como descrito por COSTA (2002). As frações positivas para taninos foram reunidas. A acetona foi completamente removida das frações combinadas por meio de evaporação sob pressão reduzida a 30°C. A amostra aquosa foi congelada, liofilizada por 72 horas, e estocada em freezer eletrônico 280 *Frost Free* (-18°C), ao abrigo da luz. A liofilização foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Vacinas da empresa Vallée S.A.. A atividade antibacteriana das

frações reunidas foi avaliada. O produto do isolamento foi quantificado pelo método de difusão radial.

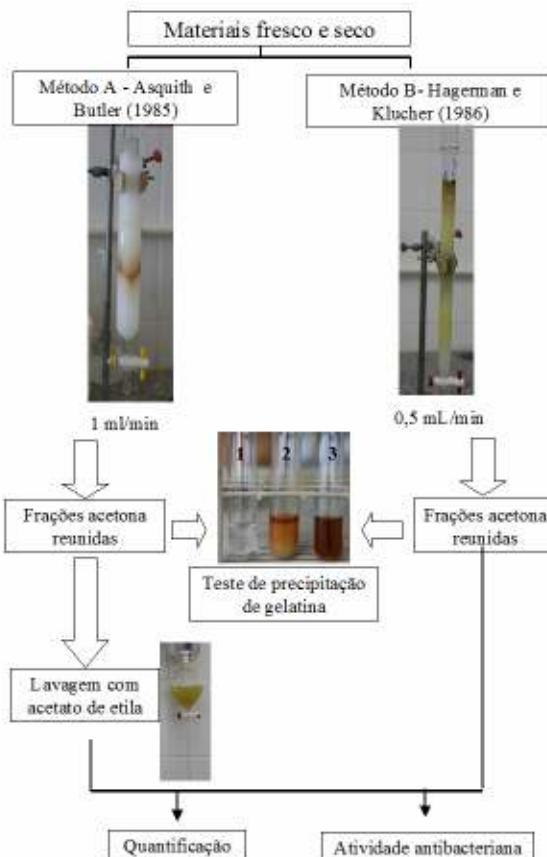


Figura 11: Esquema dos dois métodos de isolamento A e B, com demonstração da diferença existente entre ambos.

4.2.3 Determinação do rendimento do extrato bruto e das frações eluídas das colunas

Para determinação do rendimento do extrato bruto (acetona 70%) obtido, dividiu-se a massa final do extrato seco em gramas pela massa inicial do material vegetal utilizado na extração (massa seca) em gramas. O resultado da divisão foi multiplicado por 100.

Para determinação da porcentagem de material recuperado das amostras aplicadas nas colunas, dividiu-se a massa seca em gramas das frações eluídas das colunas (com etanol e com acetona) pela massa seca da amostra de extrato bruto aplicada à coluna, e multiplicou-se o resultado por 100. Para o cálculo do rendimento total das frações eluídas com acetona 50% no método A, somou-se o rendimento da amostra aquosa com a amostra de acetato de etila.

4.2.4. Quantificação de taninos totais

Para o doseamento de taninos totais são empregados métodos que utilizam a propriedade dessa classe de substâncias de precipitar proteínas (SANTOS e MELLO, 1999). No presente trabalho, a concentração de taninos totais presentes nas frações combinadas de acetona 50% foi determinada pelo método de difusão radial em gel de agarose (HAGERMAN, 1987) e para isso 5mg das amostras liofilizadas foram dissolvidas em 100 µL de metanol 50%.

A fim de se comparar o teor de taninos no produto do isolamento com o teor de taninos no extrato bruto, foi realizada extração, segundo HAGERMAN (1987), do material vegetal submetido aos dois tipos de tratamento pré-extração. Foram adicionados 200 mg de massa seca do pó seco e fresco de folhas, separadamente, a 1 mL de metanol 50%. Os taninos do material vegetal foram extraídos por uma hora em temperatura ambiente e logo após as misturas foram agitadas por 3 minutos e centrifugadas a 11.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado no teste de difusão radial descrito a seguir. Todos os procedimentos para quantificação dos taninos foram realizados em triplicata.

4.2.4.1 Método de difusão radial

No gel, previamente preparado, conforme HAGERMAN (1987), foram realizadas perfurações com auxílio de cilindro de 2,8 mm de diâmetro. A cada poço formado, foram acrescentados 20 µL do sobrenadante oriundo da extração ou da amostra liofilizada dissolvida em metanol. Neste teste o tanino difunde-se através do gel contendo proteína, e o precipitado visível, no disco formado, desenvolve-se porque os taninos interagem com as proteínas do gel. A área do disco é linearmente relacionada à quantidade de taninos colocada no poço. Após 96 horas de incubação a 30°C, os diâmetros dos anéis foram medidos, em milímetros. A quantidade de taninos precipitados foi determinada a partir de curva de calibração de ácido tânico. Para quantificação dos taninos do extrato bruto utilizou-se uma curva com concentrações menores de ácido tânico (1, 2, 3, 4 e 5 mg/mL), enquanto para o doseamento de taninos das amostras liofilizadas outra curva foi utilizada com concentrações de 5; 7,5; 10; 12,5 e 15 mg/mL. Os dados foram apresentados como uma área de precipitado tanino-proteína em cm² por grama de massa seca de folha (OSSIPOV *et al.*, 1997).

4.2.5 Atividade Antibacteriana

Como no capítulo anterior foram utilizados nos testes de atividade antibacteriana as duas variantes do método de difusão em ágar (disco e poço). As amostras liofilizadas de taninos, obtidas por meio dos dois métodos de isolamento, foram dissolvidas em DMSO de modo que se obtivesse uma concentração final de 14 mg/mL para o teste em poço, e 70 mg/mL para o teste em disco. Todos os procedimentos para avaliação da atividade antibacteriana das amostras de taninos foram realizados em triplicata.

Os testes de inibição do crescimento bacteriano foram realizados com as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Cepas padrão semeadas em ágar BHI-Infuso-cérebro-coração (Biobrás) com óleo mineral (Ideal) foram repicadas em ágar Müller-Hinton (Biobrás) e incubadas por 24 horas em estufa a 35 °C. A partir de culturas recentes, foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina NaCl 0,98% com turvação equivalente a Escala de McFarland 0,5 (1×10^8 células/mL) (NCCLS, 2003).

4.2.5.1 Difusão em ágar - Variante Poço

As suspensões bacterianas foram semeadas com auxílio de *swab* estéril em placas de petri contendo 70 mL de ágar Müller-Hinton. A perfuração dos poços no meio sólido foi realizada com auxílio de cilindro de 6 mm de diâmetro.

A cada poço foram adicionados 50 µL de amostra dissolvida (frações e extrato bruto). Foram utilizados 50 µL de DMSO como controle negativo. Como controle positivo, utilizou-se 50 µL de solução de tetraciclina a 0,6 mg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* e a mesma concentração de cloranfenicol para *Staphylococcus aureus*. As placas foram incubadas em estufa por 18 h a 35 °C. Após a incubação, foram medidos, em milímetros, os diâmetros dos halos de inibição formados ao redor dos orifícios (VALGAS *et al.*, 2007).

4.2.5.2 Difusão em Ágar - Variante Disco

As suspensões dos microrganismos-teste foram semeadas com o auxílio de *swab* estéril em placas de Petri que continham ágar Müller-Hinton. O teste de difusão em disco foi baseado na Norma M2-A8 do NCCLS 2003.

Foram utilizados discos Blank estéreis de 6 mm de diâmetro (Cecon), embebidos com 10 µL de amostra. As placas foram incubadas a 35°C durante 18 horas. Após a incubação, realizou-se a medida do halo de inibição formado em torno dos discos, em milímetros. Discos comerciais de cloranfenicol 30µg (Laborclin) foram utilizados como controle positivo para *S. aureus*. Para *P. aeruginosa* utilizou-se discos de tetraciclina 30µg (Laborclin). Discos impregnados com 10 µL de DMSO foram usados como controle negativo.

4.2.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados no sistema estatístico R, Versão 2.8.0 (R-CORE, 2008), com utilização de modelos lineares generalizados. O modelo adequado foi estimado a partir da eliminação de variáveis não significativas testadas a partir do modelo completo, método backward (CRAWLEY, 2005). Foi usada análise de variância (ANOVA) para examinar cada uma das variáveis explicativas (método de isolamento, método de difusão, material vegetal, cepas testadas e interações duplas entre as variáveis) em relação a variável resposta (halo de inibição).

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1 Isolamento de taninos

Na extração com acetona, ao contrário do que ocorreu com o metanol no capítulo anterior, o extrato oriundo de material vegetal fresco ($37,79 \pm 1,79\%$) apresentou maior rendimento que o seco ($16,97 \pm 1,79\%$) (ANOVA, $P=0,01452$). HAGERMAN (1988) confirmou o aumento significativamente superior na extração de taninos, tanto condensados como hidrolisáveis, pela extração com acetona-água em relação a metanol-água. Apesar dessas informações serem importantes, é fundamental frisar que a estabilidade dos taninos em meio acetona-aquoso é inferior do que em meio metanol-água (SANTOS e MELLO, 1999).

Os cromatogramas da Figura 12 mostram o monitoramento das frações etanólicas em 280 nm e das frações com acetona a 430 nm em espetrofotômetro, para os métodos A, desenvolvido por Asquith e Butler em 1985, e B, desenvolvido por Hagerman e Klucher em 1986. O gel de Sephadex LH-20 adsorve taninos em álcool e libera-os em acetona aquosa (HAGERMAN, 2002). Como ilustrado pelos cromatogramas, observou-se durante a eluição com etanol 95% uma zona de absorção até aproximadamente 400 minutos para o método A (Figura 12A e 12B) e até cerca de 600 minutos para o método B (Figura 12C e 12D). As outras substâncias permaneceram firmemente aderidas ao topo da coluna, até serem eluídas com acetona 50% formando um único pico nos dois métodos. O único pico eluído com acetona aquosa começou a ser registrado de 700 a 1000 minutos (Figura 12A e 12B) com o método A e de 1300 a 2000 minutos (Figura 12C e 12D) com o método B. Essa diferença no tempo de retenção dos picos entre os métodos se deve a diferença de fluxo entre as colunas. Na coluna utilizada no método A o fluxo foi de 1 mL/min, enquanto no método B foi de 0,5 mL/min.

Em todas as frações de acetona 50% (que correspondem ao último pico) observou-se formação de precipitado com o teste de precipitação de gelatina. A diferença no tamanho dos picos dos cromatogramas se deve a diferenças nas concentrações das amostras aplicadas nas colunas.

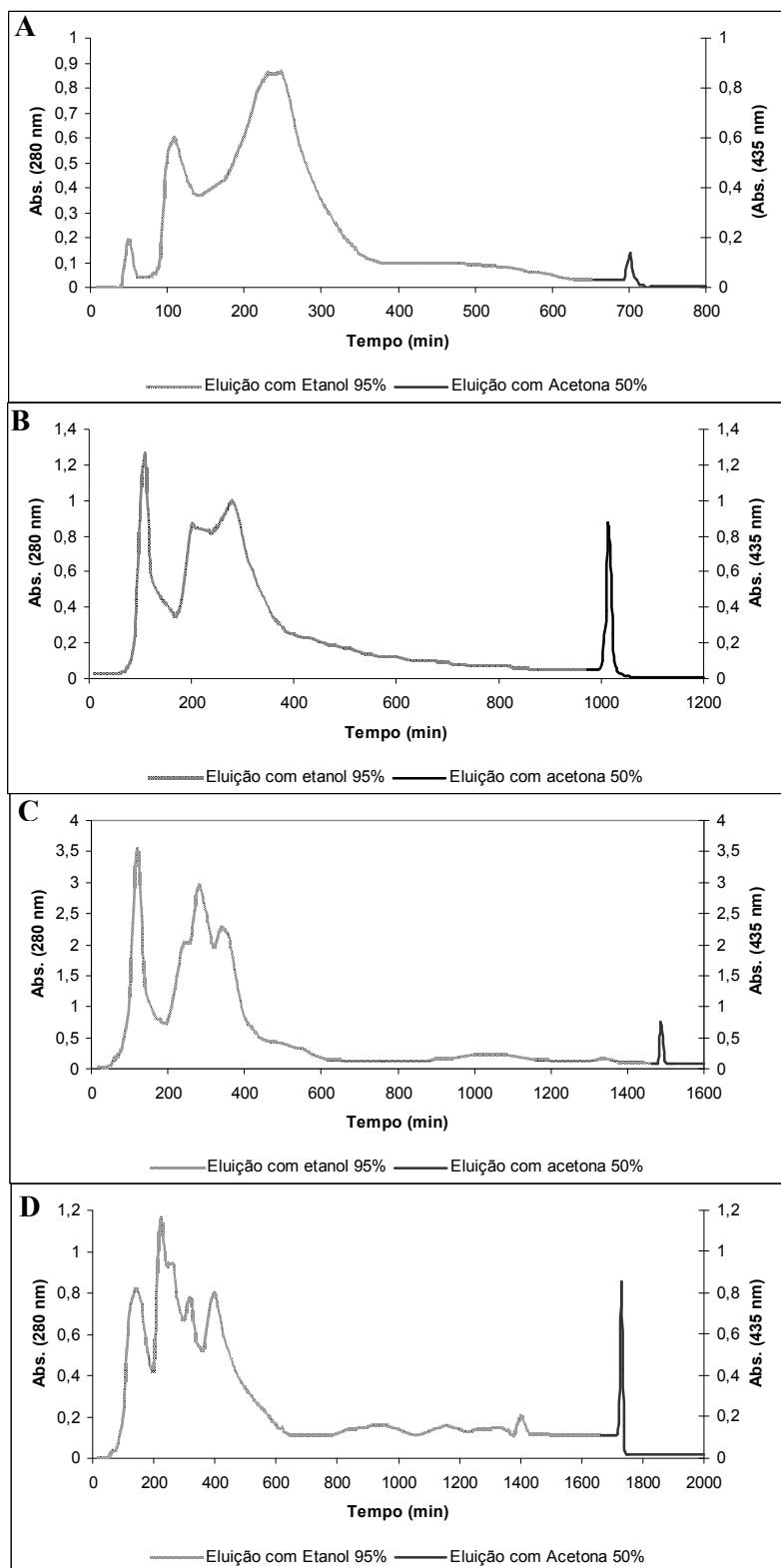


Figura 12: Monitoramento de fracionamento de compostos fenólicos por adsorção em sephadex LH-20 e eluição com etanol 95% (em 280 nm) seguida por acetona 50% (em 435 nm). (A) Método A, material vegetal seco; (B) Método A, material vegetal fresco; (C) Método B, material vegetal seco; (D) Método B, material vegetal fresco.

Em relação ao rendimento das frações que eluíram da coluna, não houve diferença entre os dois métodos de isolamento A e B, conforme Tabela 2. Para o cálculo do rendimento das frações de acetona 50% do método A somou-se o rendimento da amostra aquosa com a amostra de acetato de etila. Por esse motivo, já era esperado que os dois métodos não apresentassem diferença em seu rendimento. A única diferença observada ocorreu entre os rendimentos das amostras obtidas de material fresco e seco, tanto para as frações eluídas com etanol quanto para as que eluíram com acetona. Nos dois tipos de frações (etanol 95% e acetona 50%), o rendimento das amostras oriundas do extrato seco foi maior, conforme é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Rendimento das frações eluídas da coluna com etanol e com acetona, empregando-se os métodos de isolamento A e B, para ambos os tipos de material vegetal (Fresco e Seco).

Frações	Rendimento (%) em relação ao extrato bruto			
	Método A - Fresco	Método A - Seco	Método B - Fresco	Método B - Seco
Etanol 95%	22,30 ± 3,80	43,68 ± 3,80	22,30 ± 3,80	43,68 ± 3,80
Acetona 50%	12,66 ± 1,77	22,05 ± 1,77	12,66 ± 1,77	22,05 ± 1,77

Houve, portanto, recuperação total de aproximadamente 35% da amostra aplicada a coluna para material fresco e de 66% para material seco. Sendo assim, apesar do extrato bruto oriundo de material fresco ter apresentado maior rendimento, o rendimento das frações eluídas das colunas não apresentaram o mesmo comportamento. Pelo contrário, as frações oriundas de material seco apresentaram maior rendimento. Esse fato sugere que grande parte dos componentes do extrato fresco não eluíram. As porcentagens obtidas por WANG e LEE (1996) com extrato fresco de frutos de *Areca catechu* para as frações etanólicas e de acetona foram, respectivamente, 47% e 30%, com recuperação total de aproximadamente 77%.

4.3.2 Quantificação de Taninos Totais

Os taninos são, por definição, agentes que precipitam proteínas e os testes de taninos baseados na precipitação de proteínas são bastante populares (SCHOFIELD *et al.*, 2001).

As curvas de calibração da Figura 13 foram utilizadas para quantificar taninos de *Psidium guineense*. A curva com menor conteúdo de ácido tântico (Figura 13A) foi utilizada para quantificação do extrato bruto, enquanto a outra curva (Figura 13B) foi utilizada para quantificação de taninos das frações combinadas de acetona 50%.

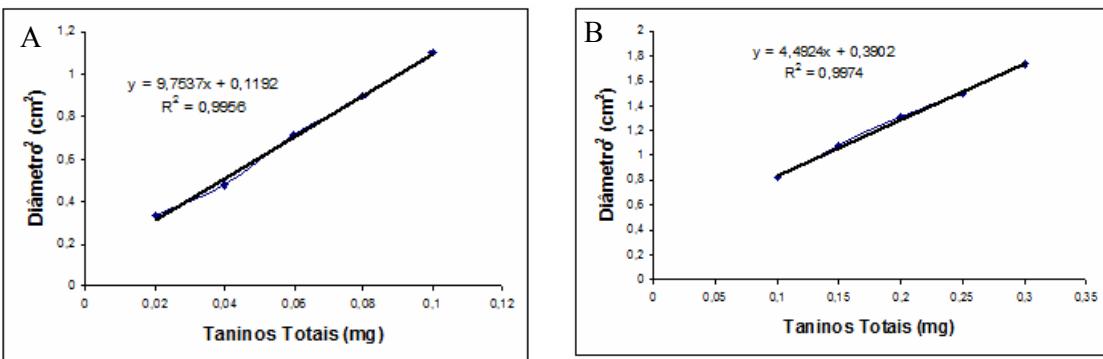


Figura 13: Curvas de Calibração de Ácido Tânnico (método de difusão radial em gel de agarose). Os dados são apresentados como a medida do diâmetro formado pelo precipitado tanino-proteína (em cm²), em função da quantidade de ácido tânnico (em miligramas) aplicada nos poços. (A) apresenta menor conteúdo de ácido tânnico; (B) apresenta conteúdo maior de ácido tânnico.

A quantidade de amostra de extrato metanólico bruto (material seco e fresco) aplicada no poço foi de 4 mg (200 mg/mL). A quantidade de taninos totais presentes na amostra do extrato bruto foi de $0,0174 \pm 0,0017$ mg (0,44% ou 4,35 mg/g de matéria seca) para material fresco e de $0,0287 \pm 0,0017$ mg (0,72% ou 7,18 mg/g de matéria seca) para o material seco (Figura 14). No material seco, portanto, foi extraído maior quantidade de taninos totais (ANOVA, $P=0,01016$).

HAGERMAN e BUTLER (1994) afirmam que tecidos frescos, congelados ou liofilizados podem ser usados na extração de taninos, embora em geral, o material fresco apresente melhores resultados. OKUDA *et al.* (1989) demonstraram que alguns compostos fenólicos decompõem rapidamente sob luz solar direta ou se secos em temperaturas elevadas. Mas segundo SANTOS e MELLO (1999), a liofilização é o método ideal, uma vez que a análise de tecidos frescos é inconveniente e mesmo a secagem ao ar pode alterar os teores de taninos. Para MUELLER-HARVEY (2001), não é possível recomendar um único procedimento para todos os tipos de amostras, pois a extratibilidade dos taninos pode também depender da maturidade sazonal dos tecidos e do tipo de planta ou tanino.

O conteúdo de taninos totais presentes nas frações combinadas de acetona 50% também foi quantificado por meio deste método. A quantidade de amostra aplicada nos poços foi de 1mg (50 mg/mL). Somente amostras oriundas de material seco foram avaliadas. A quantidade de taninos totais presentes na amostra constituída pelas frações de acetona reunidas foi de $0,312 \pm 0,008$ mg (31,2% ou 312 mg/g de matéria seca) para o método A e $0,257 \pm 0,008$ mg (25,7% ou 257 mg/g de matéria seca) para o método B (Figura 15). Os valores obtidos por WANG e LEE (1996), com *Areca catechu*, foram de aproximadamente 160 mg/g de matéria seca para taninos totais, sendo 121 mg/g para taninos condensados.

Ainda, segundo WANG e LEE (1996), somente nas frações de acetona 50% são encontrados taninos condensados. Já os taninos hidrolisáveis estão presentes também nas frações eluídas com etanol 95%, mas em quantidade menor. Nas frações de acetona, além de taninos condensados e hidrolisáveis, também estão presentes alguns flavanóides como antocianidinas, catequinas e leucoantocianidinas, e fenóis simples.

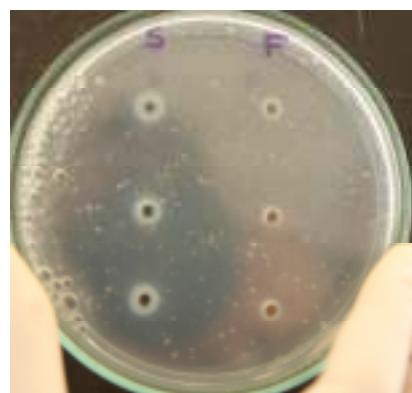


Figura 14: Ilustração dos halos de precipitado tanino-proteína, formados na quantificação de taninos totais dos extratos metanólicos brutos, seco (esquerda) e fresco (direita), de *Psidium guineense*, pelo método de difusão radial em gel de agarose.

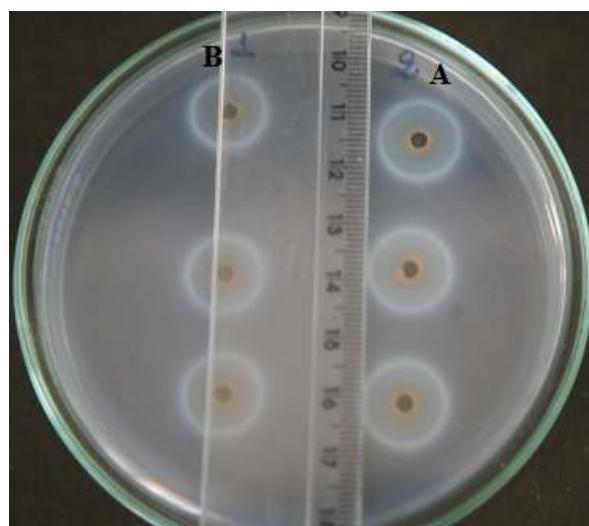


Figura 15: Ilustração dos halos de precipitado tanino-proteína formados na quantificação de taninos totais das amostras oriundas dos métodos de isolamento A (direita) e B (esquerda) de material seco de *Psidium guineense*, pelo método de difusão radial em gel de agarose.

O maior teor de taninos apresentado pela amostra oriunda do método de isolamento A em relação ao método B (ANOVA, $P=0,009145$) pode ter ocorrido devido a maior concentração de compostos nesse isolado. No método A, a fração de acetona 50% foi lavada com acetato de etila, permitindo uma maior concentração dos compostos que permaneceram na fase aquosa.

Comparando-se o teor de taninos totais no extrato bruto (7,18 mg/g de matéria seca) e na fração de acetona 50% (312 mg/g e 257 mg/g de matéria seca), observa-se que é enorme a diferença entre ambos, demonstrando que realmente grande parte dos taninos foi isolada na fração de acetona 50%, por meio dos métodos avaliados neste trabalho.

4.3.3 Atividade antibacteriana

Os resultados dos testes antibacterianos de difusão em ágar com *Pseudomonas aeruginosa*, expressos por meio da medida do diâmetro dos halos de inibição dos taninos isolados pelo método A e B e dos controles são apresentados na Figura 16 e ilustrados na Figura 18.

Os compostos isolados pelos métodos A e B apresentaram atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* com uma concentração quase três vezes menor (14 e 70 mg/mL) que a das frações semipuras (40 e 200 mg/mL) testadas no capítulo anterior. Para o método de isolamento A, o tipo de material vegetal e o método de difusão influenciaram no diâmetro do halo de inibição, sendo que maior atividade inibitória foi observada no material seco e na difusão em poço (Figura 16). Para o isolamento B, o método de difusão não influenciou no diâmetro do halo, mas o material vegetal seco apresentou maior atividade em relação ao material fresco (Figura 16).

A atividade inibitória apresentada pelos compostos isolados de extrato oriundo de material seco pode estar relacionada com a sua maior concentração de taninos em relação ao material fresco. Estes compostos apresentariam maior capacidade de difusão em poço, uma vez que maior atividade inibitória foi observada com essa variante no método A. Conforme foi verificado nos resultados da quantificação de taninos totais, o método A apresentou maior concentração de taninos que o Método B.

Considerando-se somente a variante disco (Figura 16A), o método de isolamento B apresentou halo de inibição maior que A. Entretanto, com a variante poço (Figura 16B), o método A apresentou maior halo. Isso pode ser explicado pela melhor difusão em poços dos compostos obtidos por meio do método A.

Não houve diferença entre os halos formados pela tetraciclina, tanto em relação ao material vegetal, quanto para o método de difusão. O controle negativo (Dimetilsulfóxido) não apresentou halo de inibição em nenhum dos testes realizados (Figura 16).

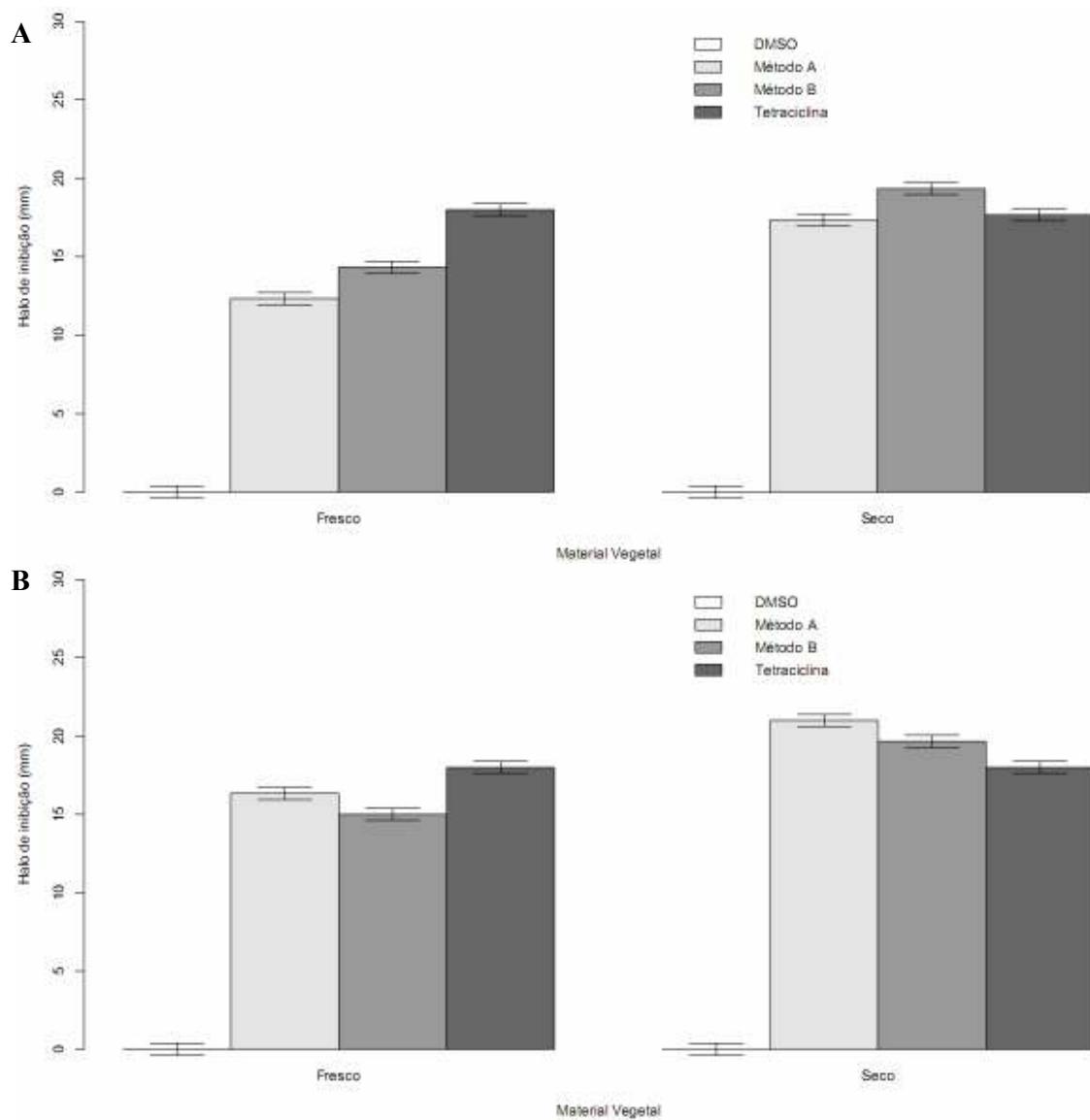


Figura 16: Medidas do diâmetro do halo de inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, formados por amostras oriundas dos métodos de isolamento e pelos controles (positivo e negativo), em função do material vegetal utilizado (seco e fresco). (A) *Pseudomonas aeruginosa* + variante disco; (B) *Pseudomonas aeruginosa* + variante poço.

Os resultados dos testes antibacterianos de difusão em ágar com *Staphylococcus aureus*, expressos por meio da medida do diâmetro dos halos de inibição dos taninos isolados pelo método A e B e dos controles são apresentados na Figura 17 e ilustrados na Figura 18.

Os compostos isolados pelos métodos A e B inibiram o crescimento de *S.aureus*, mesmo com uma concentração quase três vezes menor que a das frações semipuras testadas no capítulo anterior. O comportamento das amostras oriundas dos isolamentos seguiu o mesmo perfil apresentado pelos resultados com *P. aeruginosa*, apenas com a diferença de que em ambos os métodos de isolamento, o tipo de material vegetal e o método de difusão influenciaram o diâmetro do halo de inibição (Figura 17).

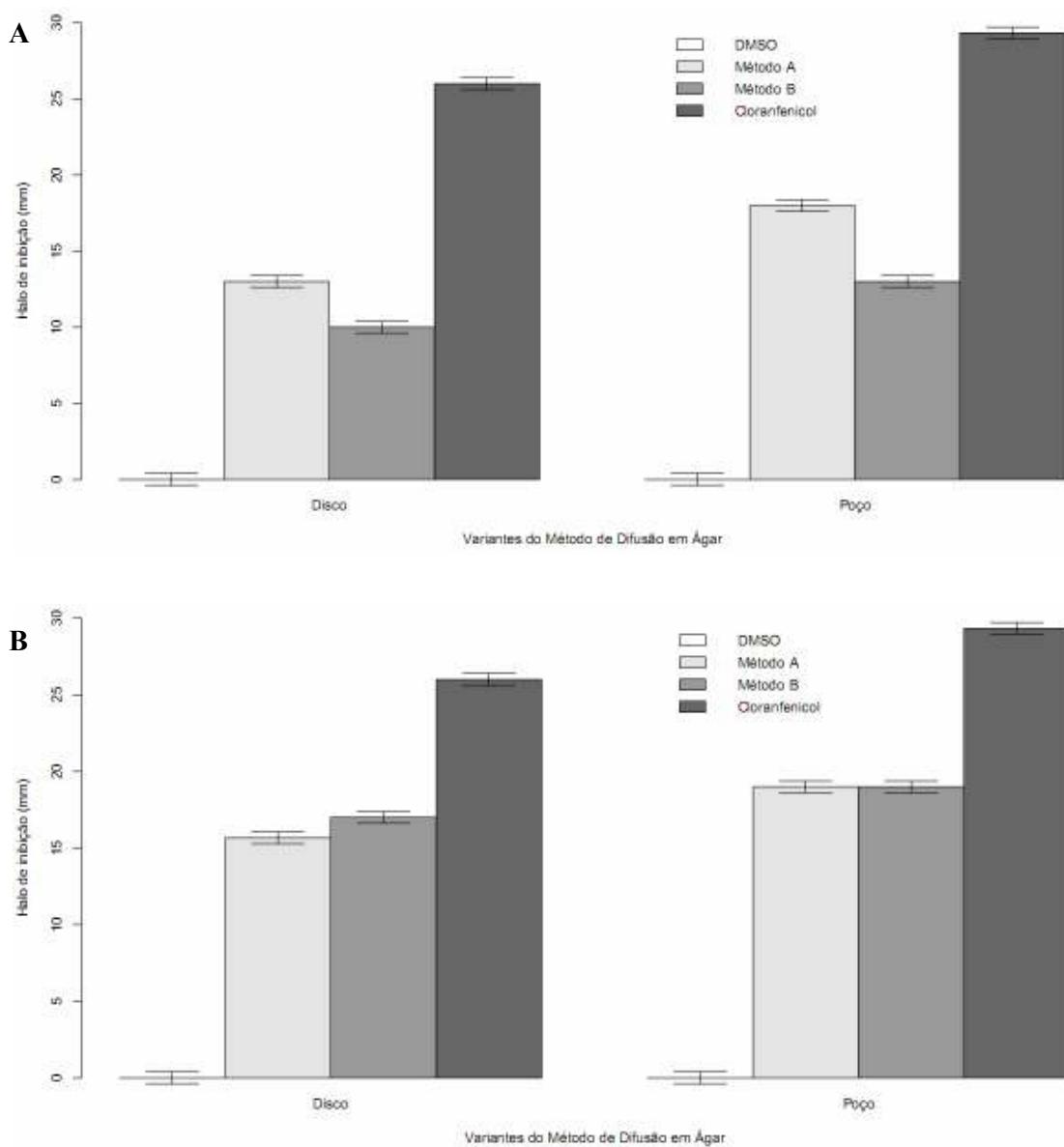


Figura 17: Medidas do diâmetro do halo de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, formados por amostras oriundas dos métodos de isolamento e pelos controles (positivo e negativo), em função das variantes do método de difusão em ágar. (A) *Staphylococcus aureus* + material vegetal fresco; (B) *Staphylococcus aureus* + material vegetal seco.

Considerando-se somente o material vegetal fresco, o método A apresentou maior halo de inibição que o B (Figura 17A). Já quanto ao material vegetal seco, o método B apresentou maior atividade inibitória com a variante disco, e não houve diferença entre os métodos com a variante poço (Figura 17B). A maior atividade inibitória do método B em relação ao A com a variante disco deve-se ao fato dos compostos de A não difundirem bem em disco.

Nenhuma amostra, oriunda dos métodos de isolamento, forneceu medida de halo de inibição igual ou maior ao do controle positivo. Apesar de apresentarem alto teor de taninos,

os materiais obtidos por meio dos dois métodos de isolamento não consistem em amostras puras. Além disso, o método de difusão é conhecido como uma técnica qualitativa, uma vez que estes métodos somente dão idéia da presença ou ausência de substâncias com atividade antimicrobiana (VAN DEN BERGHE e VLIETINCK, 1991). Para que se conheça a real potencialidade destas amostras na inibição do crescimento bacteriano, deve ser avaliada a concentração inibitória mínima das mesmas. Entretanto, a presença de substâncias que inibem o crescimento microbiano nos extratos, já é um indicativo de potencialidade.

O controle negativo, DMSO, não apresentou atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus*. O controle positivo, cloranfenicol, apresentou inibição conforme esperado e apresentou variações entre os métodos de difusão em disco e poço.

Segundo VALGAS *et al.* (2007), compostos de natureza polar difundem melhor em poço do que em disco, porque as várias hidroxilas livres presentes em cada resíduo de glicose que forma a superfície do disco hidrofílico, podem fazer com que estes compostos adsorvam a superfície do disco e não difundam no meio. Conseqüentemente, um composto catiônico polar que apresente uma boa atividade antibacteriana, pode não evidenciá-la pelo método de difusão em disco. Os resultados obtidos neste capítulo corroboram com essa proposição, uma vez que os taninos são compostos de natureza polar. Como se verificou anteriormente, a amostra com maior teor de taninos, oriunda do método de isolamento A, apresentou maior halo de inibição com a variante poço.

Quanto ao material vegetal, é curioso as amostras de material seco apresentarem melhores resultados tanto no teor de taninos como na atividade antibacteriana. O tecido fresco é o mais indicado para extração de taninos, devido à instabilidade destes compostos na secagem ao sol ou em estufa (HAGERMAN e BUTLER, 1994). Possivelmente, a qualidade dos taninos extraídos do material fresco é melhor, mas essa característica pode não ter sido evidenciada por sua baixa extratibilidade de taninos.

Testes biológicos extensivos realizados com extratos ricos em taninos têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substâncias (MELLO *et al.*, 1996, SCALBERT, 1991; HASLAM, 1996). Relatos de vários testes *in vitro* com taninos demonstram interações potencialmente significativas com sistemas biológicos, tais como atividade antiviral, antibacteriana, moluscicida, inibição enzimática, antioxidante e propriedades de captura de radicais livres. Sua tendência para interferir com sistemas biológicos é pelo menos em parte, devido à sua habilidade característica de formar complexos com macromoléculas, além de sua natureza polifenólica (DE BRUYNE *et al.*, 1999b).

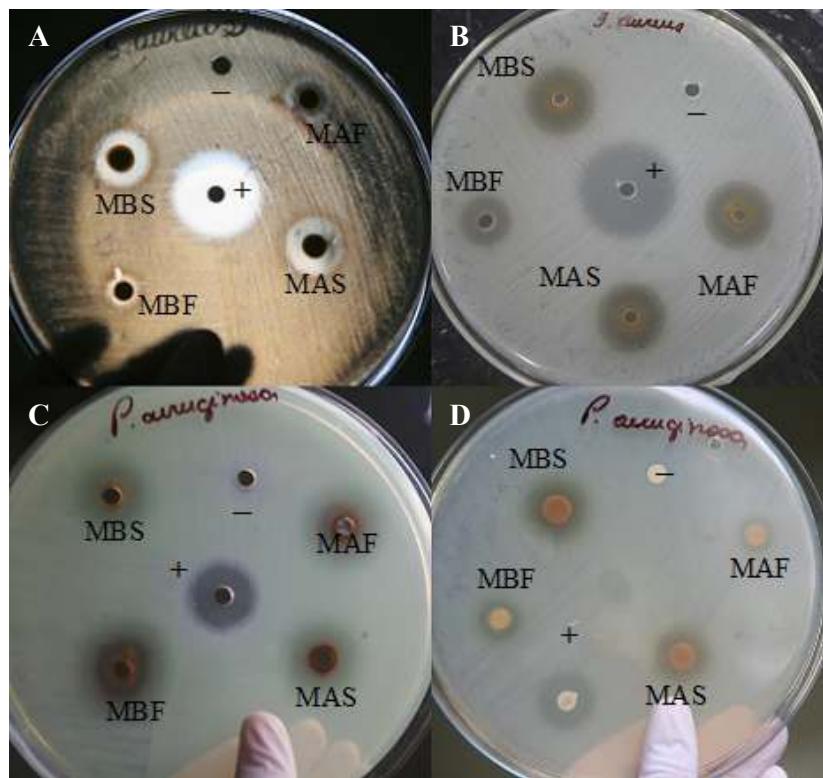


Figura 18: Testes antibacterianos de difusão em ágar, mostrando os halos de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* (acima) e *Pseudomonas aeruginosa* (abaixo), formados pelas amostras obtidas dos isolamentos A e B. (A) *S. aureus*- variante disco; (B) *S. aureus*- variante poço; (C) *P. aeruginosa*- variante poço; (D) *P. aeruginosa* - variante disco.

* (-) = controle negativo; MAF = método A, material fresco; MAS = método A, material seco; MBF = método B, material fresco; MBS = método B, material seco; (+) = controle positivo.

SCALBERT revisou as propriedades antimicrobianas dos taninos em 1991. Ele listou 33 estudos que têm documentado as atividades inibitórias dos taninos. De acordo com seus resultados, os taninos podem ser tóxicos para fungos filamentosos, leveduras e bactérias.

DE BRUYNE *et al.* (1999a) investigaram a possível influência de parâmetros estruturais individuais e configuracionais dos taninos sobre alguns sistemas biológicos, por meio da avaliação das propriedades de uma série de dímeros de proantocianidinas. Nenhum dos compostos testados foi ativo contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi*, *Enterobacter cloaca*, *Mycobacterium fortuitum*, *Staphylococcus aureus* ou *Candida albicans* (concentração inibitória mínima >100 μ g/mL). Os resultados revelaram uma moderada atividade antibacteriana de certos compostos contra *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris* em concentrações \leq 100 μ g/mL.

NELSON *et al.* (1997) estudaram interações entre taninos purificados de 3 plantas diferentes (quebracho, desmodium e myrtle) com 5 estirpes de bactérias presentes no rúmen. A ligação das bactérias aos taninos foi avaliada como um indicativo da atividade

antibacteriana destes compostos. Os taninos condensados de myrtle e desmodium tiveram alta capacidade de ligação com as bactérias e foram mais inibitórios aos micróbios.

MILLA *et al.* (1996) avaliaram se os taninos, nos tecidos das plantas, tornam o ferro indisponível aos microrganismos e concluíram que as propriedades quelantes dos polifenóis contribuem para limitar o crescimento de microrganismos. Sendo assim, a colonização de plantas por bactérias ou fungos patogênicos depende do desenvolvimento de sistemas bioquímicos particularmente eficientes para deslocar o Fe³⁺ de complexos polifenol-ferro. Tais propriedades podem acontecer em folhas ou frutos onde as proantocianidinas têm mostrado limitar a infecção por patógenos. Trabalhos posteriores realizados por CHUNG *et al.* (1998), mostraram que alguns microrganismos produzem agentes quelantes de baixa massa molecular que se ligam ao ferro e verificaram que o crescimento de *Escherichia coli*, inibido por ácido tântico, foi restaurado pelo suplemento adicional de ferro.

DONOVAN e BROOKER (2001) investigaram a resistência de *Streptococcus gallolyticus* e *Streptococcus bovis* frente a taninos condensados e ácido tântico e observaram que tanto *S. gallolyticus* como *S. bovis* foram inibidos pela presença de taninos no meio; isto foi claramente verificado pela extensa fase lag antes do crescimento exponencial, e a taxa de crescimento reduzida. Embora ambas as espécies exibiram uma extensa fase lag, *S. bovis* foi aproximadamente 30 vezes mais sensível ao ácido tântico e ao tanino condensado de acácia que *S. gallolyticus*.

4.4 Conclusões

As amostras obtidas por meio dos dois métodos de isolamento de taninos propostos por Asquith e Butler, em 1985, e por Hagerman e Klucher, em 1986, inibem o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e de *Staphylococcus aureus*. Os taninos são extraídos, em maior quantidade, do material vegetal seco. Com o uso deste tipo de material vegetal, é obtida uma recuperação total de 66% do material aplicado na coluna. O primeiro método citado é mais efetivo no isolamento dos taninos e seu produto apresenta maior halo de inibição do crescimento bacteriano em relação ao método B. Em geral, nos dois métodos de isolamento, os compostos que apresentam atividade antibacteriana estão presentes, em maior quantidade, nas amostras oriundas de material seco e apresentam maior capacidade de difusão em poço. Verifica-se, portanto, uma relação entre teor de taninos na amostra e inibição do crescimento bacteriano. Estes dados sugerem que os taninos de *Psidium guineense* apresentem atividade antibacteriana frente a *S.aureus* e *P. aeruginosa*, tendo em vista os vários estudos que têm identificado diversas atividades biológicas apresentadas por essa classe de substâncias.

Referências Bibliográficas

- APPEL, H.M. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. **Journal of Chemical Ecology**. v. 19, p. 1521-1552, 1993.
- CHUNG, K.T.; LU, Z.; CHOU, M.W. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. **Food and Chemical Toxicology**. v. 36, p. 1053-1060, 1998.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. V 3. Lisboa: Fundação Caloustre Gulbekian. 2002. 1031p.
- CRAWLEY, M.J. **Statistical: An introduction using R**. New York: Jhon Wiley e Sons. 2005, 761p.
- DE BRUYNE, T. PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A.J. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities . **Biochemistry and Systematic Ecology**. v. 27, p. 445-459, 1999a.
- DE BRUYNE, T. PIETERS, L.; WITVROUW, M.; DE CLERCQ, E.; BERGHE, D.V.; VLIETHINCK, A.J. Biological evaluation of proanthocyanidins and related polyphenols. **Journal of Natural Products**. v. 62, p. 954-958, 1999b.
- DONOVAN, L.O. e BROOKER, J.D. Effects of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. **Microbiology**. v. 147, p. 1025-1033, 2001.
- HAASE, K.; WANTZEN, K.M. Analysis and decomposition of condensed tannins in tree leaves. **Environmental Chemistry Letters**. v. 6, p. 71-75, 2008.
- HAGERMAN, A.E. Radial diffusion method for determination tannin in plant extracts. **Journal of Chemical Ecology**. v. 13, n. 3, p. 437-449, 1987.
- HAGERMAN, A.E. **Tannin Chemistry**. 2002. Disponível em: <<http://www.users.muohio.edu/hagermae>> Acesso em: 12 mar. 2008.
- HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.E. Assays of condensed tannins or flavonoids oligomers and related flavonoids in plants. **Methods in Enzymology**. v. 234, p. 429-437, 1994.
- HAGERMAN, A.E.; RICE, M.E. RITCHARD, N.T., Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin₁₆(4->8) catechin (procyanidin). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 46, p. 2590-2595, 1998.
- HAGERMAN, A.E. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. **Journal of Chemistry and Ecology**, v. 14, p. 453-461, 1988.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**. v. 59, p. 205-215, 1996.

HATTORI, M.; KUSUMOTO, L.T.; NAMBA, T.; ISHIGAMI, T.; HARA, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosil transferase from *Streptococcus mutans*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 38, p. 717-720, 1990.

KAKIUCHI, N., HATTORI, M., NISHIZAWA, M., YAMAGISHI, T., OKUDA, T. and NAMBA, T. Studies on dental caries prevention by traditional medicines. VIII. Inhibitory effect of various tannins on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 34, n. 2, p. 720-725, 1986.

KAKIUCHI, N.; KUSUMOTO, I.T.; HATTORI, M.; NAMBA, T.; HATANO, T.; OKUDA, T. Effect of condensed tannins and related compounds on reverse transcriptase. **Phytotherapy Research**. v. 5, p. 270–272, 1991.

KAWAMOTO, H.; NAKATSUBO, F.; MURAKAMI, K. Stoichiometric studies of tannin-protein co-precipitation. **Phytochemistry**. v. 41, p. 1427-1431, 1996.

KHANBABAEI, K.; REE, T.V. Tannins: classification and definition. **Natural Product Reports**. v. 18, p. 641-649, 2001.

KUMAR, R. e VAITHIYANATHAN, S. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. **Animal Feed Science Technology**. v. 30, p. 21-38, 1990.

MELLO, J.C.P.; PETERREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**. v. 41, n. 3, p. 807-813, 1996.

MILA, I.; SCALBERT, A.; EXPERT, D. Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and roots. **Phytochemistry**. v. 42, n. 6, p. 1551-1555, 1996.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**. v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**. v. 91, p. 3-20, 2001.

NELSON, K.E.; PELL, A.N.; DOANE, P.H.; GINER-CHAVEZ, B.I.; SCHOFIELD, P. Chemical and biological assays to evaluate bacterial inhibition by tannins. **Journal of Chemical Ecology**. v. 23, n. 4, p. 1175-1194, 1997.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. New methods of analyzing tannins. **Journal of natural products**, v. 52, p. 1-31, 1989.

OSSIPOV, V.; LOPONEN, J.; OSSIPPOVA, S.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. Gallotannins of birch *Betula pubescens* leaves: HPLC separation and quantification. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 25, p. 493-504, 1997.

QUEIROZ, C.R.A.A.; MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**. v. 26, n.4, p. 485-492. 2002.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>> Acesso em: 05 set. 2008.

SAKANAKA, S.; AIZAWA, M.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. Inhibitory effects of green tea polyphenols on growth and cellular adherence of oral bacterium, *Porphyromonas gingivalis*. **Biosciences Biotechnology and Biochemistry**. v. 60, n. 5, p. 745-749, 1996.

SALMINEN, J.P.; OSSIPOV, V.; LOPONEN, J.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography - mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 864, p. 283-291. 1999.

SANTOS, S.C. e MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1999, p. 614-656.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**. v. 30, p. 3875-3883. 1991.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**. v. 91, p. 21-40, 2001.

TAKECHI, M.; TANAKA, Y.; TAKEHARA, M.; NONAKA, G.-I.; NISHIOKA, I. Structure and antiherpetic activity among the tannins. **Phytochemistry**. v. 24, p. 2245–2250, 1985.

VAN DEN BERGHE D.A., VLIETINCK AJ. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Hostettman K, editor. **Methods in plant biochemistry, assays for bioactivity**. London: Academic Press; 1991. v.6, p.47-69.

VALGAS, C.; SOUZA, S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JR A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 369-380, 2007.

WANG, C. K. e LEE, W. H. Separation, Characteristics, and Biological Activities of Phenolics in Areca Fruit. **Journal Agricultural Food Chemical**. v. 44, n. 2014-2019. 1996.

YOSHIDA, T.; CHOU, T.; MATSUDA, M.; YASUHARA, T.; YAZAKI, K. HATANO, T.; NITTA, A.; OKUDA, T. Woodfordin D and oenothein A, trimeric hydrolysable tannins of macro-ring structure with antitumoral activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 39, p. 1157-1162, 1991.

ZUCKER, W. V. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. **The American Naturalist**. v. 121, n. 3, p. 335-365, 1983.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados obtidos por meio deste trabalho e as diversas literaturas em que ele se baseou, conclui-se que:

As frações semipuras obtidas do extrato metanólico de *Psidium guineense* apresentam atividade antibacteriana, o que sugere que mais de um tipo de substância seja responsável por este potencial apresentado pela planta.

Os taninos são extraídos, em maior quantidade, do material vegetal seco em relação ao material fresco, e o método proposto por Asquith e Butler, em 1985, é mais efetivo no isolamento dos taninos que o método de Hagerman e Klucher, em 1986.

As amostras obtidas por meio dos dois métodos de isolamento de taninos, propostos por Asquith e Butler e por Hagerman e Klucher, inibem o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e de *Staphylococcus aureus*.

Os compostos que apresentam atividade antibacteriana estão presentes, em maior quantidade, nas amostras oriundas de material seco, e apresentam maior capacidade de difusão em poço.

Existe uma relação entre teor de taninos na amostra e inibição do crescimento bacteriano, o que sugere que os taninos de *Psidium guineense* apresentem atividade antibacteriana frente a *S.aureus* e *P. aeruginosa*.

Trabalhos posteriores, de avaliação das concentrações inibitória e bactericida mínima, devem ser realizados, a fim de que se conheçam as reais potencialidades das amostras ricas em taninos, para inibição do crescimento bacteriano.

A purificação das amostras também é um passo necessário para comprovar as propriedades antibacterianas dos taninos de *P. guineense*. Deve-se ainda dar prosseguimento ao estudo deste compostos, tendo em vista as várias atividades farmacológicas associadas a essa classe de substâncias.

Tendo em vista o exposto acima e o fato das propriedades antibacterianas de *Psidium guineense* não ser exclusiva de uma única classe de compostos, pode-se afirmar que esta espécie apresenta um grande potencial para estudos farmacológicos.