



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

NADINE CUNHA COSTA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO
EXTRATO DAS SEMENTES DE *Passiflora edulis* Sims E FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS**

São Luís

2016

NADINE CUNHA COSTA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO
EXTRATO DAS SEMENTES DE *Passiflora edulis* Sims E FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS**

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

Orientadora: Prof^ª. Dra. Patricia de Maria Silva Figueiredo

Co-orientador: Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt

São Luís

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

C837e Costa, Nadine Cunha.

Estudo fitoquímico e atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato das sementes de *Passiflora edulis* Sims e formulações farmacêuticas. / Nadine Cunha Costa. – Gurupi, TO, 2016.

64 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2016.

Orientador: Patricia de Maria Silva Figueiredo

Coorientador: Gessiel Newton Scheidt

1. Resistência. 2. Maracujá-amarelo. 3. Antibacteriano. 4. Antifúngico. I. Título

CDD 660.6

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

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

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

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



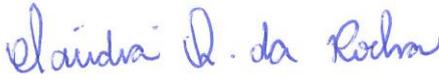
Ata de Defesa nº 14/2016

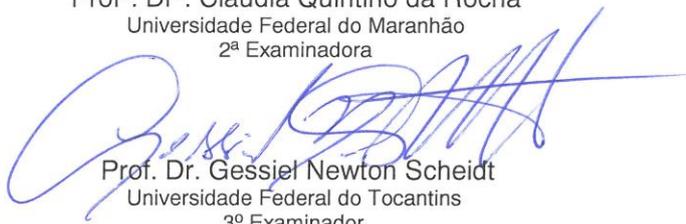
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE NADINE CUNHA COSTA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS.

Aos 02 dias do mês de setembro do ano de 2016, às 09:00 horas, no campus de São Luis(MA) da Universidade Federal do Maranhão, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof^a. Orientadora Dr^a. PATRÍCIA DE MARIA SILVA FIGUEIREDO, da Universidade Federal do Maranhão, Prof^a. Dr^a. DENISE FERNANDES COUTINHO MORAES, da Universidade Federal do Maranhão, Prof^a. Dr^a. CLÁUDIA QUINTINO DA ROCHA, da Universidade Federal do Maranhão e Prof. Dr. GESSIEL NEWTON SCHEIDT, da Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência da primeira, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de NADINE CUNHA COSTA, intitulada "**Estudo fitoquímico e atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato das sementes de *Passiflora edulis* Sims e formulações farmacêuticas**". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, com as devidas ressalvas e correções apontadas pela banca examinadora, habilitando-a ao título de Mestre em Biotecnologia. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


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


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


Prof^a. Dr^a. Cláudia Quintino da Rocha
Universidade Federal do Maranhão
2^a Examinadora


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

São Luis, 02 de setembro de 2016.


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

AGRADECIMENTOS

No caminho desta conquista muitos foram os desafios, mas sempre tive em quem me apoiar para vencê-los. Sou grata a Deus pela sua fiel companhia e por todos aqueles que Ele tem apresentado na minha vida para me abençoar.

Agradeço aos meus pais, Olimpio e Lucelita, pelo exemplo, por todo amor e por tudo que renunciaram para me dar condições de alcançar este sonho. Agradeço também aos meus irmãos, Janine e Danilo, pelo carinho de sempre.

À minha orientadora Prof^a. Dra. Patricia de Maria Silva Figueiredo, pelo auxílio e paciência ao longo desta jornada. Agradeço ao meu co-orientador, Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt, pelo apoio que viabilizou o desenvolvimento desta pesquisa e também por suas valiosas contribuições.

Agradeço à CAPES pelo auxílio financeiro e aos docentes do Programa Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins, que colaboraram para a minha formação profissional.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão pelo apoio, em especial Emmeline, Leandra, Luciene, Ribamar, Fonteles, Lydia, Alyne, Jéssica, Cássio, Denise, Júnior e Margareth.

Aos dois grandes amigos, Talison Ferreira e Jéssyca Wan Lume pela a honra que tive de conhecê-los durante o tempo que estive cursando disciplinas no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFMA e pela troca de experiência diária, aqui representados pelo Laboratório de Fitoterapia do Departamento de Farmácia-UFMA.

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais do CCET- UFMA, em especial Marcos Bispo, Anderson e Carol e aos professores Dr. Gilvan de Oliveira Costa Dias, Dra. Joselene Ribeiro de Jesus Santos e Dra. Cláudia Quintino da Rocha pela forma carinhosa com que me receberam e por todos os ensinamentos transmitidos.

Ao pequeno Pedro Victor pelo amor compartilhado nos momentos em que mais precisei.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para esta vitória. Muito obrigada!

“O sertanejo é, antes de tudo, um forte”.

Euclides da Cunha

RESUMO

O *Passiflora edulis* Sims (maracujá-amarelo) pertence à família Passifloraceae que possui cerca de 16 gêneros e 600 espécies. O gênero *Passiflora* é considerado o mais representativo, com 135 espécies vegetais. O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil fitoquímico e a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato das sementes de *Passiflora edulis* Sims e desenvolver formulações farmacêuticas. Observou-se na triagem fitoquímica a presença de fenóis como flavonoides, taninos condensados e cumarinas além de saponinas e alcaloides. A quantificação de polifenóis totais e flavonoides foram realizadas totalizando $480 \pm 4,833$ (mgGA)/g e $12,4 \pm 0,014$ (mgQE)/g respectivamente. Foram identificadas nas análises de CCD o aparecimento sugestivo de óleo fixo na fração hexânica revelada com vapores de iodo e presença de compostos fenólicos nas frações diclorometano e acetato de etila utilizando fase móvel hexano e acetato de etila (Hex:AcOEt) quando revelada com FeCl₃. As análises por LC-MSⁿ forneceram os perfis de fragmentação do composto fenólico (CF) confirmando a existência de uma nova molécula orgânica Isoflavona. O extrato apresentou quinze vezes maior potencial antioxidante quando comparado ao padrão trolox (mg/g). Utilizou-se as técnicas de perfuração em ágar e macrodiluição com o extrato e as formulações farmacêuticas desenvolvidas: gel 5%, solução 1% e sabonete íntimo 5% com suas estabilidades verificadas por três dias, além da avaliação do controle de qualidade microbiológico. O extrato apresentou maior potencial de inibição contra bactérias Gram-positivas para o isolado clínico de *Enterococcus faecalis* (10,50 mm) e as formulações não manifestaram atividade pela técnica em ágar. As análises quantitativas confirmaram melhor potencial bactericida do extrato contra *Enterococcus faecalis* CBM (0,6 mg/mL) e o gel apresentou melhor atividade contra *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 27010 CBM (0,017 mg/mL). A melhor ação do extrato foi contra o sorotipo EAEC 042 (11,33 mm) de todas as bactérias Gram-negativas estudadas pela técnica em ágar. A resposta do extrato com melhor ação bactericida nas análises quantitativas foi contra *Morganella morganii* (0,6 mg/mL). Neste estudo as melhores respostas observadas foram contra os isolados clínicos de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, onde o extrato e as formulações apresentaram forte potencial antifúngico. Houve resistência de *Candida parapsilosis* sobre o extrato e as formulações farmacêuticas. E apenas a solução 1% não apresentou nenhuma atividade sobre os organismos analisados pelas técnicas descritas.

Palavras-chave: resistência; maracujá-amarelo; antibacteriano; antifúngico

ABSTRACT

Passiflora edulis Sims (Passion fruit) belongs to Passifloraceae family which has about 16 genera and 600 species. The *Passiflora* genus is considered the most representative, with 135 plant species. This study aimed to evaluate the phytochemical profile, and the in vitro antimicrobial activity of extract from the seed of *Passiflora edulis* Sims, and to develop pharmaceutical formulations. It was observed in phytochemical screening, the presence of phenols, such as flavonoids, condensed tannins, and coumarins, also saponins and alkaloids. Quantification of total polyphenols and flavonoids were held totaling $480 \pm 4,833$ (mgGA)/g e $12,4 \pm 0,014$ (mgQE)/g, respectively. It was found in the Thin Layer Chromatography Analysis, the suggestive appearance of fixed oil in hexane fraction revealed, with iodine vapor, and presence of phenolic compounds in the dichloromethane and ethyl acetate fractions by using the mobile phase of hexane and ethyl acetate (Hex:AcOEt) when revealed using FeCl₃. The LC-MSⁿ analysis provided the fragmentation profile of the phenolic compound (PC) confirming the existence of a new Isoflavone organic molecule. The extract showed potential antioxidant fifteen times greater when compared to standard trolox (mg/g). It was used diffusion in agar and microdilution techniques, with the extract and pharmaceutical formulations developed: 5% gel, 1% solution, and 5% intimate soap with its stability checked for three days, also with the evaluation of the microbiological quality control. The extract has shown greater inhibition potential on Gram-positive bacteria for the clinical isolate of *Enterococcus faecalis* (10.50 mm), and formulations have not shown activity by agar method. Quantitative analysis has confirmed better bactericidal potential of extract on *Enterococcus faecalis* MBC (0.6mg/mL), and the gel has shown better activity on *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 27010 MBC (0.017mg/mL). The extract has shown better effect on 042 EAEC serotype (11.33 mm) of all Gram-negative bacteria studied by the technique in agar. The response of the extract with better bactericidal effect on quantitative analysis was on *Morganella morganii* (0.6mg/mL). In this study, the best responses were observed on clinical isolates of *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida glabrata*, wherein the extract and the formulations showed strong antifungal potential. There was resistance from *Candida parapsilosis* on the extract, and the pharmaceutical formulations. Only 1% of the solution haven't showed activity on the microorganisms analyzed by the techniques described.

Keywords: resistance; passion fruit; antibacterial; antifungal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: CCDC do fracionamento do EB-HEtOH das sementes de <i>Passiflora edulis</i> Sims com hexano e acetato de etila (80:20) revelada com vapores de iodo	34
Figura 2: Identificação de compostos fenólicos após aplicação de FeCl ₃	34
Figura 3: Cromatograma de composto fenólico obtido da (F-CH ₂ Cl ₂) a partir da fase móvel AcOEt:CHCl ₃ : MeOH (70:20:10) através de ESI-IT-MS	35
Figura 4: Principais fragmentações observadas do CF por ESI-IT-MS ⁿ das sementes de <i>Passiflora edulis</i> Sims	36
Figura 5: Porcentagem de inibição do radical DPPH em diferentes concentrações do EH das sementes de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	38
Figura 6: Redução do radical DPPH em diferentes concentrações do EH das sementes de <i>Passiflora edulis</i> Sims pela mudança de coloração.....	38
Figura 7: Teste de estabilidade das preparações obtidas do EH de <i>Passiflora edulis</i> Sims pelo método de centrifugação.....	39
Figura 8: Zona de inibição do EH das sementes de <i>Passiflora edulis</i> Sims sobre <i>E. faecalis</i> pela técnica de perfuração em ágar.....	43
Figura 9: Verificação da CIM e CBM das sementes de <i>Passiflora edulis</i> Sims pela técnica de macrodiluição sobre <i>C. diphteriae</i> ATCC 27010.....	45
Figura 10: Zona de inibição do EH das sementes de <i>Passiflora edulis</i> Sims sobre EAEC 042 pela técnica de perfuração em ágar.....	46
Figura 11: Verificação da CIM e CBM das sementes de <i>Passiflora edulis</i> Sims sobre <i>M. morgani</i> pela técnica de macrodiluição	47
Figura 12: Zona de inibição do EH e do sabonete íntimo das sementes de <i>Passiflora edulis</i> Sims sobre fungos de interesse clínico	49
Figura 13: Atividade antimicrobiana do EH e do sabonete íntimo das sementes de <i>Passiflora edulis</i> Sims pela técnica de macrodiluição sobre fungos de interesse clínico.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Formulações desenvolvidas a partir do EH: gel, solução e sabonete íntimo.....	23
Tabela 2: Classes de metabólitos secundários analisados na triagem fitoquímica do EH das sementes de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	25
Tabela 3: Análise da triagem fitoquímica do EH das sementes de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	31
Tabela 4: Avaliação quantitativa dos constituintes químicos polifenóis (mgGA)/g e flavonoides totais (mgQE)/g do EH das sementes de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	32
Tabela 5: Atividade antioxidante em diferentes concentrações do EH das sementes de <i>Passiflora edulis</i> Sims	37
Tabela 6: Avaliação do controle de qualidade microbiológico do EH e das formulações obtidas das sementes de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	40
Tabela 7:Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> do EH e das formulações pela técnica de perfuração em ágar sobre micro-organismos gram-positivos de interesse clínico	42
Tabela 8: Análise da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do EH e das formulações sobre bactérias gram-positivas de interesse clínico	44
Tabela 9: Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> do EH e das formulações pela técnica de perfuração em ágar sobre micro-organismos gram-negativos de interesse clínico	45
Tabela 10: Análise da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do EH e das formulações sobre bactérias gram-negativas de interesse clínico	47
Tabela 11: Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> do EH e das formulações pela técnica de em ágar sobre fungos de interesse clínico	49
Tabela 12: Análise da Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do EH e das formulações sobre fungos de interesse clínico	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – Brain Heart Infusion

BHT – Hidroxitolueno butilado

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CCF– Cromatografia de Camada Fina

CCDC – Cromatografia de Camada Delgada Comparativa

CH₃COCH₃ – Acetona

CH₃COCH₃ – Ácido acético

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CTT – 2,3,5 trifenil-tetrazólio

DPPH – 1,1-difenil-2-picrildazila

EB-HEtOH – Extrato bruto hidroalcolico

EH – Extrato hidroalcolico

F-AcOet – Fração acetato de etila

F-CH₂Cl₂ – Fração diclorometano

F-Hex – Fração hexano

INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial

MeOH – Metanol

mgAG – Equivalente ácido gálico

mgQE – Equivalente quercetina

PCA – Plate Count Agar

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Biodiversidade.....	14
2.2 Plantas Medicinais.....	15
2.3 Metabolômica.....	17
2.4 Resistência microbiana	18
3 OBJETIVOS	21
3.1 Geral	21
3.2 Específicos	21
4 METODOLOGIA	22
4.1 Tipo de estudo e local da pesquisa	22
4.2 Material Botânico	22
4.3 Obtenção do extrato hidroalcólico	22
4.4 Formulações farmacêuticas obtidas do EH.....	23
4.5 Estudo de estabilidade das formulações farmacêuticas	23
4.6 Controle de qualidade microbiológico do extrato e das formulações farmacêuticas .	24
4.7 Triagem fitoquímica	24
4.8 Determinação do teor de polifenóis totais	26
4.9 Determinação do teor de flavonoides totais	26
4.10 Fracionamento e análises de Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC).....	26
4.11 Isolamento e identificação do composto fenólico (CF).....	27
4.12 Atividade antioxidante	27
4.13 Avaliação da atividade antimicrobiana	28
4.13.1 Micro-organismos utilizados	28
4.13.2 Padronização das suspensões bacterianas e fúngicas.....	28
4.13.3 Análise antimicrobiana pela técnica de perfuração em ágar	29
4.13.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).....	29
4.14 Análise estatística.....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.15 Análise da triagem fitoquímica	31
4.16 Avaliação do teor de polifenóis totais e flavonoides	32
4.17 Avaliação do perfil cromatográfico do EB-HEtOH de <i>Passiflora edulis</i> Sims através de CCDC.....	33
4.18 Caracterização estrutural do CF obtido da F-CH ₂ Cl ₂ através de LC- ESI-MS ⁿ	36
4.19 Análise da atividade antioxidante	37
4.20 Análise dos testes de estabilidade das formulações farmacêuticas	39
4.21 Avaliação do controle de qualidade microbiológico do extrato e das formulações farmacêuticas	40
4.22 Análise da atividade antimicrobiana pelas técnicas de perfuração e macrodiluição sobre micro-organismos gram-positivos.....	42

4.23 Análise da atividade antimicrobiana pelas técnicas de perfuração e macrodiluição sobre micro-organismos gram-negativos	45
4.24 Análise da atividade antimicrobiana pelas técnicas de perfuração e macrodiluição sobre fungos de interesse clínico	48
5 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO.....	64

1 INTRODUÇÃO

A medicina deste século passa por um momento de extrema incerteza uma vez que novas e velhas doenças infecciosas desafiam cada vez mais os paradigmas da ciência e mobilizam a comunidade científica quanto ao aparecimento da resistência microbiana. Assim, a manifestação recorrente de bactérias e fungos resistentes aos antimicrobianos na clínica tem reforçado a necessidade de novas investigações para o desenvolvimento de fármacos com ação antimicrobiana (HARBARTH; SAMORE, 2005).

Neste contexto, uma das principais alternativas que tem sido alvo de estudos em diferentes países do mundo, é a utilização de plantas medicinais como potencial para a descoberta de novas moléculas que possuem ação no tratamento de infecções. Por meio dos extratos vegetais obtidos de plantas medicinais são verificados metabólitos secundários em abundância, os quais são conhecidos por conter em sua composição substâncias com propriedades antimicrobianas (GIBBONS, 2004).

Entre os anos 1981 e 2006, 109 novos antimicrobianos foram aprovados, 69% destes correspondem a antibacterianos e outros 21% aos antifúngicos provenientes de espécies vegetais ou de rotas químicas derivadas a partir de seus metabólitos (NEWMAN, 2008). Além disso, mais de 50% dos princípios ativos com ação antimicrobiana foram isolados através de recursos naturais, o que comprova o quanto a indústria farmacêutica é altamente dependente de medicamentos à base de plantas. Por tudo isso, os produtos naturais têm recebido interesse significativo como fonte de novos medicamentos na terapêutica (KRIEF, 2004).

Sabe-se que cerca de 80% da população mundial depende de plantas medicinais para os cuidados de atenção básica de saúde. Tal fato justifica-se pela facilidade com que as plantas são encontradas, além de serem economicamente mais viáveis e consideradas de origem natural (BANKAR; DOLE, 2015). Além disso, a automedicação pelo uso de extratos vegetais ganhou popularidade desde a década de 1990, uma vez que um grande número desses compostos começou a serem disponibilizados em farmácias e lojas de produtos naturais sem a necessidade de prescrição médica (NEWMAN, 2008).

Em contrapartida, os problemas que vem sendo ocasionados pelo número excessivo de prescrições de antimicrobianos e pelo uso abusivo desses fármacos, especialmente pelo aparecimento de novas resistências, tem sido reconhecido como problema de saúde pública (COWAN, 1999). A resistência microbiana pode estar relacionada a diversos fatores, a saber: características moleculares dos patógenos, fatores de virulência, fatores relacionados ao hospedeiro e aqueles relacionados aos centros de saúde pelos diferentes mecanismos de

patogenicidade viável dos micro-organismos (HARBARTH, SAMORE, 2005).

O *Passiflora edulis* Sims pertence à família Passifloraceae que possui cerca de 600 espécies, o Brasil é o país com maior biodiversidade dessa família. O gênero *Passiflora* é o mais representativo, com 135 espécies vegetais (BERNACCI et al., 2015). O maracujá é um nome popular de origem indígena das tribos Tupi e Guarani, e deriva de *murukuia*, que significa “alimento em forma de cuia” (PIRES; JOSÉ, 2011).

É uma fruta multifuncional rica em vitamina C, cálcio e fósforo, podendo ser consumida naturalmente ou industrializada. Sendo de origem tropical, seu suco se destaca pela boa aceitação entre os consumidores e suas cascas e sementes podem ser reaproveitadas pelo processo de esmagamento da fruta para a obtenção do suco (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004). Atualmente, os resíduos industriais obtidos do processamento do suco do maracujá-amarelo são utilizados por produtores rurais na suplementação de alimentação animal, como ração para bovinos e aves e as sementes como fontes de óleo, carboidratos, proteínas e minerais utilizadas principalmente na indústria de perfumaria e aromas (KOBORI; JORGE, 2005).

Tradicionalmente, suas folhas, caules, raízes e frutos tem sido utilizada na medicina popular, como sedativo, antiespasmódico, ansiolítico (ULMER, 2004; AKHONDZADEH et al., 2001; DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004), contra hipertensão e diabetes (NIPPON, 1993), anti-inflamatório (RUDNICKI et al., 2007), antioxidante (RUDNICKI et al., 2007; DEVAKI; SUNITHA, 2009), antibacteriano (YULDASHEVA et al., 2005; AKANBI; BODUNRIN; OLAYANJU, 2011) e antifúngico (KANNAN; DEVI; JAYAKAR, 2010). Nos últimos anos, devido às suas propriedades fitoterápicas, etnobotânicas e riqueza fitoquímica, pesquisas tem demonstrado interesse crescente sobre esta espécie vegetal como critérios de seleção de moléculas naturais de importância farmacêutica. Assim, este estudo tem como objetivo verificar o perfil fitoquímico e a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcolólico das sementes de *Passiflora edulis* Sims e formulações farmacêuticas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biodiversidade

No Brasil, encontra-se uma das maiores biodiversidades existente no planeta, tanto pelas suas riquezas e abundâncias de espécies, quanto pela variabilidade local e a diversidade de ecossistemas e biomas presentes no país. Os principais biomas brasileiros são a Floresta Amazônica, considerada a maior floresta tropical do mundo, a Mata Atlântica, a Floresta Tropical, o Cerrado, o Pantanal e a Caatinga. Estes biomas reúnem a mais diversificada flora do mundo, com mais de 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% de toda a biodiversidade mundial (FERRO; BONACELLI; ASSAD, 2006; RODRIGO, 2009).

Nos últimos 20 anos, apesar da riqueza da flora brasileira, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente (FONSECA, 2012). Até o momento, estima-se que apenas 10% da biodiversidade mundial tenha sido estudada. Deste modo, a biodiversidade pode ser compreendida como uma preciosa biblioteca genética mantida em seus ecossistemas naturais, da qual apenas uma pequena parcela de seus componentes foi adequadamente estudada e cujos benefícios futuros ainda são desconhecidos (GUERRA; NODARI, 2004).

A economia mundial baseia-se principalmente em produtos e processos relacionados à biodiversidade. Acredita-se que 40% da economia está ligada em particular aos setores de alimentos, combustíveis, fibras, madeira, extratos, óleos, medicamentos e cosméticos (CDB, 2011; CNI, 2014). Esse cenário demonstra que a diversidade biológica é constantemente referida como uma das possíveis fontes de vantagem competitiva para o Brasil sendo a indústria farmacêutica um dos setores mais promissores para seu aproveitamento (PIMENTEL et al., 2015).

Um número expressivo de indústrias multinacionais farmacêuticas, alimentares e biotecnológicas têm se apropriado de plantas e conhecimentos indígenas rurais para obtenção de novos produtos especialmente de espécies vegetais da Amazônia. Essa problemática está relacionada ao conceito de biopirataria pela exploração, manipulação e exportação de recursos biológicos com fins comerciais indevidos (RECH et al., 2015). Diante das acusações de biopiratarias por empresas multinacionais no Brasil, houve necessidade de implementar uma política governamental estabelecida pela Lei nº 13.123 de 20 de Maio de 2015 com o objetivo de controlar e limitar o uso da biodiversidade brasileira (SACCARO JUNIOR, 2013). O

problema não é uma exclusividade do Brasil, poucos países construíram um marco regulatório nacional e em todos os casos ainda são necessários ajustes (NKHATA et al., 2012).

Uma das aplicações mais antigas e consolidadas há milhares de anos da biodiversidade é a obtenção de substâncias com propriedades curativas. Inúmeros povos ao longo da história descobriram nas plantas seus efeitos terapêuticos para tratar as enfermidades e até hoje essa prática é comum em diferentes países, inclusive no Brasil (CDB, 2011). Essa associação pode estar relacionada com a interação do homem com os recursos genéticos dos ecossistemas naturais, hoje conhecido como conhecimento tradicional associado. Esse saber, adquirido ao longo do tempo pela comunidade, pode servir no direcionamento de alvos específicos nas pesquisas científicas para a utilização racional dos recursos naturais, com a finalidade de desenvolver novos produtos através da chamada bioprospecção (SACCARO JUNIOR, 2013).

Embora praticamente todos os setores da indústria possam se inspirar na natureza e produzir inovações, provavelmente o mais representativo é o mercado farmacêutico (PATERSON; ANDERSON, 2005). Sabe-se que cerca de 50% dos fármacos disponíveis na terapêutica foram desenvolvidos com base em moléculas biológicas, no caso de drogas antineoplásicas e antimicrobianas essa proporção pode atingir até 70% (UNU-IAS, 2005).

2.2 Plantas Medicinais

O consumo de plantas medicinais no Brasil é anterior à chegada dos Portugueses em 1.500. Gradativamente, os colonizadores perceberam os valiosos recursos da medicina indígena e acabaram construindo sua própria farmacopeia. O uso de plantas medicinais pelo homem acompanha a sua história. Registros arqueológicos apontam a sua importância cultural desde 60.000 anos a.C., povos antigos como os Egípcios, Gregos, Hindus, Persas e mais recentemente os povos da América Pré-colombiana, aplicavam cotidianamente os recursos terapêuticos onde viviam contribuindo para a construção da medicina tradicional dispersa ao redor do mundo (ROCHA et al., 2015).

Ao longo do séc. XVI, informações disponíveis acerca de plantas medicinais, suas indicações e posologias, eram sistematicamente observadas pelos missionários na medida em que a colonização adentrava sobre as regiões do Recôncavo Baiano, Floresta Amazônica e Zonas Costeiras. O conhecimento tradicional uma vez registrado por estes missionários, era apropriado e adaptado pelos padres jesuítas, de modo que pudessem elaborar suas próprias prescrições (WALKER, 2013).

O uso de plantas medicinais no Brasil é bastante difundido e suas potencialidades neste setor são reconhecidas mundialmente (SIMÕES, 2000). Plantas medicinais podem ser definidas como vegetais que possuem substâncias com ação farmacológica. Estima-se que pelo menos a metade das espécies nativas tenha alguma propriedade medicinal, entretanto nem 1% foi estudada adequadamente (MARTINS et al., 2003).

O uso de plantas medicinais pela população brasileira é significativo, a maioria das pessoas encontram nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos. Isso se justifica tanto pela riqueza da biodiversidade, pela tradição popular desta prática, mas principalmente pelo baixo poder aquisitivo da população que não dispõe de recursos financeiros para aquisição de medicamentos industrializados (DI STASI, 1996). Assim, para garantir a segurança do uso de plantas medicinais pela sociedade como terapêutica utilizada no tratamento de enfermidades, são necessárias não apenas medidas de controle, mas realização de campanhas que promovam informações sobre o uso racional dessa prática relatando os riscos e benefícios existentes encontrados a partir de seu uso (SILVA et al., 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhecendo essa realidade lançou em 1972, um incentivo à medicina tradicional, colocando a fitoterapia como uma das práticas mais importantes pelo potencial encontrado nessa terapia aliado ao custo benefício que ela poderia dispor aos seus usuários. A Fitoterapia é um recurso terapêutico caracterizado pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas que incentiva o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social (BRASIL, 2006).

Na perspectiva da integridade da atenção à saúde é importante promover uma estratégia baseada em tratamentos alternativos para oferecer a comunidade. A ampliação das opções terapêuticas ofertadas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade torna-se indispensável para o modelo de assistência básica (DUTRA, 2009). O Brasil possui vantagens e oportunidades para o desenvolvimento da fitoterapia devido ao seu potencial em biodiversidade, crescente interesse popular e institucional através das políticas de inclusão de medicamentos fitoterápicos no SUS (SANTOS, 2006).

No ano de 2006, por meio do Decreto Presidencial nº 5.813 de 22 de junho o governo federal aprovou a Política Federal de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, composta por políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social. O objetivo dessa política é “garantir à população brasileira o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o

desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional”. (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2009). A espécie de *P. edulis* encontra-se presente na lista de Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao Sus (RENISUS), como espécie vegetal de forte potencial terapêutico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

2.3 Metabolômica

Os compostos produzidos pelas plantas são distribuídos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são conhecidos por serem moléculas que se encontram em todas as células vegetais e são necessários para a vida da planta. São os açúcares, aminoácidos, proteínas, lipídios e os ácidos nucleicos. Os metabólitos secundários, ao contrário, são restritos em sua distribuição e são importantes para a sobrevivência e a propagação das plantas capazes de produzir diferentes compostos: fenóis, terpenóides, óleos essenciais, alcaloides entre outros. São essas as principais moléculas químicas responsáveis pelos efeitos medicinais, ou tóxicos, das plantas que apresentam grande importância ecológica, uma vez que podem atuar na atração de polinizadores, ou representar uma defesa química contra agentes agressores ambientais (LÓPEZ, 2006).

A grande utilidade e diversidade de metabólitos secundários dos vegetais, despertam o interesse de pesquisadores no mundo inteiro, pelo fato de o reconhecerem como fonte promissora para o isolamento de novas moléculas a serem descobertas para diferentes aplicabilidades na vida humana. As indústrias agronômicas, alimentícias e farmacêuticas têm grande interesse na descoberta dessas moléculas, pois estas, devido às suas propriedades, possuem elevada importância comercial (ARRAIS, 2012). Devido à crescente popularidade dos medicamentos fitoterápicos e a mudança de perspectiva dos consumidores que buscam cada vez mais alimentos com características bioativas que proporcionem mais saúde e bem-estar através de ativos encontrados na natureza, faz-se necessário investigações científicas de suas propriedades terapêuticas (DINIZ; ASTARITA; SANTAREM, 2007).

Na aplicação de estratégias de planejamento de fármacos oriundos do metabolismo secundários das plantas, os estudos dos processos evolutivos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos assumem grande importância, pois constituem as bases fundamentais para o entendimento de propriedades como potência, afinidade e seletividade. Por isso, as ferramentas biotecnológicas associadas aos métodos de estudos fitoquímicos ganham força no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). Os estudos fitoquímicos ajudam na investigação desses compostos através de

métodos de análises que permitem a quantificação, separação, isolamento e identificação da simbiose existentes entre centenas de diferentes metabólitos secundários encontrados em uma planta. Apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica com diferentes finalidades. Desta forma, verifica-se que o reino vegetal representa um enorme reservatório de moléculas farmacologicamente ativas a serem descobertas (PINTO, 2005).

Os metabólitos secundários são divididos em três grandes grupos distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (SHAHIDI; NACZK, 2003; SHAHIDI; HO, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2006). Dentre os terpenos, encontram-se os compostos voláteis que compõe os óleos essenciais com aplicação em sabores e perfumes, a função dos óleos essenciais nas plantas pode ser tanto para atrair polinizadores quanto para repelir insetos. Os compostos fenólicos são representados pelo um grupo bastante heterogêneo que além de sua importância na proteção de plantas contra fatores ambientais, estão presentes em frutas e em muitos sabores, odores e coloração dos vegetais. Dentre o grupo de compostos contendo nitrogênio destaca-se a classe dos alcaloides, que também tem função de defesa contra insetos e animais predadores nas plantas (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

O planejamento da pesquisa fitoquímica para identificação dos grupos de metabólitos secundários deve ser feito de acordo com os objetivos específicos que se pretende atingir, seja ele químico, farmacológico ou ainda dirigido para um determinado tipo de ação, por exemplo, inseticidas naturais, ou ainda classes especiais de substância de interesse tecnológico como os óleos fixos e óleos essenciais. Por isso, o planejamento da prospecção fitoquímica deve obedecer dois princípios: simplicidade necessária à rapidez de execução e complexidade necessária à precisão dos resultados e à maior amplitude de informações (MATOS, 2009).

As análises dos estudos fitoquímicos são importantes principalmente para aquelas espécies de plantas medicinais que ainda não dispõe de estudos químicos, tendo como objetivo conhecer estes compostos e avaliar sua presença identificando quais grupos de metabólitos secundários relevantes estão presente na qualidade da matéria prima medicinal (LEITE, 2009; SIMÕES et al., 2004). Para isto é necessário que exista uma atuação interdisciplinar nas buscas direcionadas da bioatividade levando em conta os aspectos agrotecnológicos, microbiológicos, farmacológicos e biotecnológicos (FOGLIO et al., 2006).

2.4 Resistência microbiana

As doenças infecciosas representam uma importante causa de morbimortalidade

especialmente em países em desenvolvimento. Podem ser causadas por diversos agentes, dentre eles destacam-se os fungos e bactérias, comumente isolados em amostras clínicas oriundas de pacientes com diferentes problemas de saúde. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as infecções causam 25% das mortes em todo mundo e 45% nos países menos desenvolvidos. Estas podem condicionar elevado custo social e pessoal em consequência aos dias não trabalhados, invalidez parcial ou permanente e mortes em uma parcela considerável de pacientes acometidos por tais afecções (BETONI et al., 2006).

Diante dessa problemática, o uso de antibióticos revolucionou a abordagem das infecções e o seu sucesso provocou enorme satisfação frente à prevenção e ao tratamento de processos infecciosos. Os antibióticos ou antimicrobianos, são fármacos empregados com a finalidade de ocasionar a morte ou inibir o crescimento de determinado agente microbiano. Podem ter diferentes origens, seja por uma substância produzida pelos próprios micro-organismos, isolada de vegetais, ou, mesmo através de rotas sintéticas conhecidas como quimioterápicos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). No entanto, a prescrição irracional dos antimicrobianos rapidamente provocou dificuldades para seu uso, em consequência do aumento crescente da resistência microbiana a essas drogas (MONTELLI, 2001).

A resistência microbiana independe do grupo ao qual o micro-organismo pertence, pode ser observada tanto em bactérias como fungos e é considerada um fenômeno natural e evolutivo. Dentre as bactérias associadas a este fenômeno destacam-se os bacilos Gram-negativos: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella* spp., representantes da família das *Enterobacteriaceae* comumente isolados em infecções do trato urinário e, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) nas afecções do trato respiratório inferior. Os cocos Gram-positivos, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* são predominantes encontrados em infecções cirúrgicas e sanguíneas (ECDC, 2013). Além disso, infecções fúngicas do gênero *Candida* spp. resistentes vêm aumentando consideravelmente nos hospitais e a espécie de *Candida albicans* é o principal agente isolado de afecções superficiais e invasivas. A incidência de isolados deste gênero com alto potencial de resistência vem aumentando gradativamente refletindo nos elevados índices de mortalidade associados ao referido patógeno (NUNES et al., 2011).

É de grande importância a identificação do agente etiológico nas infecções, pois a patogenicidade e o padrão de sensibilidade de cada antimicrobiano apresentam variações de acordo com o micro-organismo (BADIEE; ALBORZI, 2011).

No Brasil, os aspectos relacionados à epidemiologia e prognóstico dos pacientes são

mais expressivos quanto a mortalidade, custos e opções terapêuticas limitadas quando se retrata de um quadro de resistência microbiana. O aumento de micro-organismos patogênicos resistentes a diversas drogas associado ao concomitante elevado número de pacientes imunodeprimidos ocasionou a busca de novas alternativas terapêuticas (ANTUNES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006).

A pesquisa de extratos vegetais com ação antimicrobiana apresenta uma saída para o combate aos micro-organismos patogênicos, levando assim a procura pela descoberta de novas moléculas químicas derivadas de espécies vegetais como fonte promissora de novos agentes antimicrobianos (SILVA et al., 2007; LEITAO, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o perfil fitoquímico e a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato das sementes de *Passiflora edulis* Sims e desenvolver formulações farmacêuticas.

3.2 Específicos

- a) Realizar o perfil fitoquímico e quantificar o teor de polifenóis e flavonoides totais do extrato hidroetanólico 70% das sementes de *Passiflora edulis* Sims;
- b) Isolar e identificar informações estruturais de composto fenólico (CF) do extrato hidroetanólico 70% das sementes de *Passiflora edulis* Sims através de LC – ESI–MSⁿ;
- c) Avaliar o potencial antioxidante em diferentes concentrações do extrato hidroetanólico 70% das sementes de *Passiflora edulis* Sims;
- d) Verificar a atividade antimicrobiana do extrato e das formulações farmacêuticas de uso tópico pelo método de perfuração em ágar e pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo e local da pesquisa

O presente trabalho consistiu em um estudo experimental descritivo, realizado no Laboratório de Microbiologia Clínica e Laboratório de Desenvolvimento de Produtos e Cosméticos do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão – UFMA, onde realizou-se os testes microbiológicos e desenvolvimento das formulações farmacêuticas respectivamente. As análises químicas foram realizadas em parceria com o Centro de Ciências Exatas e Tecnologia – CCET, Laboratório de Produtos Naturais – UFMA Campus Universitário de São Luís – MA.

4.2 Material Botânico

Os frutos de *Passiflora edulis* Sims foram coletados na Fazenda Centro no município de Fortaleza dos Nogueiras – MA, com altitude de 430 m e 06° 57' 50" S e 46° 10' 38" W em Outubro de 2015 às 7:00 horas da manhã e encaminhados ao Laboratório de Produtos Naturais do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia – CCET. A exsicata desta espécie foi catalogada e identificada no Herbário Botânico Rosa Mochel da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA pela botânica Dra. Ana Maria Maciel Leite sob a numeração (4023).

4.3 Obtenção do extrato hidroalcolico

Os frutos foram lavados em água corrente para separação das sementes frescas que passaram por período de secagem a temperatura ambiente por sete dias. Posteriormente as sementes foram trituradas em liquidificador industrial (Metvisa®) e pesadas em balança analítica obtendo massa vegetal de 116g. Em seguida, esse pó foi submetido a maceração por três dias com renovação de solvente a cada 24 horas utilizando solvente hidroetanólico 70% e proporção droga:solvente de 1:3. O extrato hidroalcolico (EH), foi submetido ao rotoevaporador rotativo (Janke e Kunkel®) temperatura controlada de 40°C e obtenção de volume concentrado de 690 mL, peso seco de 0,0096 g/mL e rendimento 6% (MATOS, 2009). A obtenção do EH foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais – CCET, UFMA.

O processo de obtenção do (EH) e das formulações farmacêuticas obtidas do extrato teve a patente requerida pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) N° BR 10 2015 002897 0.

4.4 Formulações farmacêuticas obtidas do EH

Tabela1: Formulações desenvolvidas a partir do EH: gel, solução e sabonete íntimo.

Gel 5%	Solução 1%	Sabonete íntimo 5%
Carbopol 0,5%	Glicerina 15%	Lauril éter sulfato de sódio 34%
Propilenoglicol 5%	Propilenoglicol 15%	Dietanolamina de ácido graxo de coco 1,5%
Trietanolamina q.s	Álcool etílico 10%	Cocoamidopropilbetaína 5%
Extrato 5% (0,0695mg/mL)	Extrato 1% (0,0139 mg/mL)	Hidroxietilcelulose 0,5%
Água destilada q.s.p	Água destilada q.s.p	Propilenoglicol 2%
		Cloreto de sódio 0,43%
		Extrato 5% (0,0695mg/mL)
		Água destilada q.s.p

As formulações foram preparadas para obtenção de 100 mL e o sabonete íntimo teve seu pH ajustado para 4,5 com ácido cítrico 10%. Todas as formulações foram desenvolvidas com a ausência de conservantes normalmente utilizados na constituição dos excipientes (ANVISA, 2010 com adaptações).

4.5 Estudo de estabilidade das formulações farmacêuticas

Os testes de estabilidade foram executados em conformidade com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). As amostras das formulações foram submetidas ao teste de estabilidade pelo método de centrifugação onde pesou-se 10 g do produto sólido e um volume de 10 mL dos produtos líquidos depositados em tubo de ensaio cônico graduado e submetidos a rotação de

3600 rpm (Fanem®) durante 30 minutos. Espera-se que os aspectos físicos e químicos como cor, odor, uniformidade e integridade sejam mantidos dentro dos limites especificados considerados na estabilidade (BRASIL, 2004).

4.6 Controle de qualidade microbiológico do extrato e das formulações farmacêuticas

Os produtos foram diluídos na proporção 10^{-1} em solução NaCl 0.89% e posteriormente retirou-se 1,0 mL da solução para análise de contagem de micro-organismos heterotróficos pela técnica de Pour Plate em meio PCA (Plate Count Agar) (Himedia®), técnica dos tubos múltiplos pela inoculação de 1,0 mL da solução em meios Lauryl (Merck®), Verde brilhante (Coliformes totais) (Himedia®) e EC caldo (Coliformes termotolerantes) (Himedia®) respectivamente. Além disso, fez-se a pesquisa para verificação de crescimento fúngico pela técnica de Spread Plate em meio Saboraud (Merck®) pela retirada de 100 uL da solução e espalhamento com alça de Dringalski na superfície do meio.

As placas de PCA e Saboraud foram encubadas em estufa bacteriológica 37°C 24 horas e até 48 horas para as placas de meio Sabourad. Os tubos múltiplos foram levados ao banho maria SI 150 (Solab®) temperatura controlada de 37°C por 24 horas para os meios Lauryl e Verde brilhante e EC caldo 44, 5°C 24 horas. Transcorrido o tempo de incubação observou-se o aparecimento de produção de gás nos tubos de durham e o crescimento de micro-organismos nos meios PCA e Sabourad através da contagem de colônias do crescimento microbiano quando presente. Todos os testes foram realizados em triplicata para cada amostra analisada (CARDOSO, 2009).

4.7 Triagem fitoquímica

Foram aplicados métodos de avaliação qualitativos dos constituintes químicos. Resumidamente foram aplicados métodos para detecção de alcaloides (teste de Mayer e Dragendoff), taninos e fenóis (teste de FeCl_3), saponinas (teste de formação de espuma), flavonoides (teste de Schinoda) terpenóides (teste de Liberman-Burchard). A presença das classes de metabólitos secundários foram classificadas como: fortemente positivo (+++), positivo (++) , fracamente positivo (+) ou ausente (-) segundo metodologia descrita por Matos, (2009).

- Para a reação com cloreto férrico foram adicionadas 3 gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1% em 1 mL do extrato. O surgimento de coloração variável entre azul e

vermelho é indicativo da presença de fenóis e precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos hidrolisáveis e verde a presença de taninos condensados.

- A reação de Liberman-Burchard consistiu na evaporação de 30 mL do EH em banho-maria até a secura. Dissolveu-se os resíduos em 5 mL de clorofórmio e filtrou-se. Com o auxílio de uma pipeta, foi transferido para três tubos de ensaio as seguintes quantidades: 0,1 mL; 0,5 mL; 1,0 mL. Em seguida, completou-se os volumes com clorofórmio até 2 mL. Adicionou-se 1 mL de anidrido acético e 2 mL de ácido sulfúrico. A mudança de coloração do extrato para rósea ou azul indica a presença de esteroides ou triterpenos.
- Em papel filtro pingou-se 1 gota do EH com uma gota de KOH e levou-se à câmara UV para observar a formação de fluorescência. A positividade foi observada pelo aparecimento de fluorescência indicativo da presença de cumarinas.
- A pesquisa de alcaloides foi realizada através dos reativos de Mayer (Mercúrio Tetraiodeto de Potássio) e Dragendoff (Tetraiodeto Bismuto de Potássio) foi verificada pela transferência de 2 mL do EH para cinco tubos de ensaio e adicionou-se 2 gotas dos respectivos reativos. Observou-se se houve a formação de precipitado branco ou leve turvação branca para o reativo de Mayer e precipitado de cor tijolo para o reativo de Dragendoff, conforme Tabela 2. As análises fitoquímicas foram realizadas no Laboratório de Fitoterapia do Departamento de Farmácia - UFMA.

Tabela 2: Classes de metabólitos secundários analisados na triagem fitoquímica do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims

Metabólitos Secundários	Testes
Fenóis	Teste com o cloreto férrico
Taninos hidrolisáveis	Teste com o cloreto férrico
Taninos condensados	Teste com o cloreto férrico
Antocianidina, antocianina e flavonoides	Teste de mudança de pH (pH 3; 8,5 e 11)
Flavonas, flavonóis e xantonas	Teste de mudança de pH (pH 3; 8,5 e 11)
Chaconas e auronas	Teste de mudança de pH (pH 3; 8,5 e 11)
Leucoantociacianidinas, catequinas	Teste de mudança de pH (pH 3; 8,5 e 11)
Esteroides	Teste de Liberman-Burchard
Triterpenóides	Teste de Liberman-Burchard
Alcaloides	Teste com Dragendoff, Mayer e Hager

Fonte: Elaborado pelo autor (2016)

4.8 Determinação do teor de polifenóis totais

O teor de fenóis do extrato foi obtido utilizando 100 μ L da solução do EH seco (2mg/mL) etanol, 100 μ L do reagente Folin-Ciocalteu (Merck®) e 1,0 mL da solução de carbonato de sódio a 20% por duas horas em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Concentrações de ácido gálico (Merck®) foram utilizadas como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS (Lambda 35, Perkin Elmer®) $\lambda=760$ nm e os resultados expressos em mg de ácido gálico por grama do EH (BATISTA et al., 2016).

4.9 Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais do extrato foi obtido utilizando 500 μ L da solução do EH seco (2mg/mL) etanol e 500 μ L de solução metanólica de cloreto de alumínio a 5% por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Concentrações conhecidas de quercetina (Merck®) foram utilizadas como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS (Lambda 35, Perkin Elmer®) $\lambda=425$ nm e os resultados expressos em mg de quercetina por grama do EH (WOISKY; SALATINO 1998; CHAILLOU; HERRERA; MAIDANA, 2004; ABREU et al., 2006).

4.10 Fracionamento e análises de Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC)

A partir do extrato bruto hidroalcolico (EB-HEtOH) realizou-se o fracionamento com os seguintes solventes na ordem crescente de polaridade: hexano (F-Hex), diclorometano (F-CH₂Cl₂) e acetato de etila (F-AcOet). Para cada partição ocorreram duas extrações consecutivas que em seguida foram recolhidas e transferidas para frascos limpos e secos. Para analisar o comportamento destas frações preparou-se placas de cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC), utilizando sílica gel 60 G (Merck®) que posteriormente foram ativadas por 24 horas em estufa a temperatura de 110 °C.

Sobre duas placas de CCDC foram aplicadas as amostras com auxílio de tubo capilar que foram eluidas utilizando como fase móvel a mistura de hexano e acetato de etila (Hex:AcOEt) na proporção (80:20). Em seguida uma das placas foi acondicionada em cuba contendo vapores de iodo para revelação das possíveis substâncias presentes em cada amostra. E a outra foi borrifada com uma solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl₃), revelador para

compostos fenólicos. Em busca da identificação destes possíveis compostos, realizou-se mais uma análise em CCDC utilizando acetato de etila, clorofórmio e metanol (AcOEt:CHCl₃:MeOH) (70:20:10) como fase móvel segundo metodologia descrita por Seidemann, (1969). As avaliações obtidas de CCD foram executadas no Laboratório de Produtos Naturais – CCET, UFMA.

4.11 Isolamento e identificação do composto fenólico (CF)

O isolamento consistiu na adição de 1000 µL de água Milli-Q na F-CH₂Cl₂ contendo a substância CF onde permaneceu por dez minutos em sonicador UltraCleaner 750 (Unique®). Prosseguiu-se com as aplicações no cartucho CHROMABOND® C18ec de fase reversa submetido a lavagem com MeOH em seguida estabilizado através de sistema H₂O:MeOH 80:20 e eluição da amostra H₂O:MeOH 50:50. Posteriormente a amostra foi encaminhada para identificação em LC-ESI-MSⁿ. As avaliações de espectrofotometria de massa foram realizadas no Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais-UNESP (ROCHA et al., 2014 com adaptações).

4.12 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi analisada através do sistema de redução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrildazila) solução estoque 0,5 mM diluído em etanol HPLC (LiChrosolv®) 60 µM com absorvância de $0,62 \pm 0,02$ onde a substância com propriedade antioxidante presente no EH, atua reduzindo o DPPH. O EH 0,0096g/mL, foi diluído em etanol nas concentrações de 0,0048 g/mL, 0,0024 g/mL, 0,0012 g/mL e 0,006 g/mL, onde a redução do DPPH foi acompanhada por uma mudança de coloração do violeta intenso para o amarelo claro, por meio de espectrofotometria de UV-visível (Byosystem®) absorvância $\lambda = 517$ nm.

A atividade do sequestro de radicais foi expressa em miligrama de equivalente trolox (antioxidante padrão) por grama de extrato. Para construção da curva trolox, a mistura reacional foi composta de 900 µL do tampão Tris-HCl 100 mM (pH = 7,4), 40 µL de etanol, 50 µL de solução de Tween 20 0,5% (m/m), 10 µL do trolox diluído em diferentes proporções de etanol (1,25; 1,00; 0,75; 0,50; 0,375; 0,25 mg/mL) seguido de 1 mL de DPPH. A absorvância foi medida no início da reação (tempo zero), a cada 5 minutos durante os

primeiros 20 minutos e posteriormente em intervalos de 10 minutos até se tornar constante. A porcentagem de inibição (IDPPH%) foi calculada através da equação:

$$(\text{IDPPH}\%) = \left[1 - \left(\frac{\text{Abs}_A}{\text{Abs}_B} \right) \right] \times 100$$

Onde Abs_A e Abs_B são as absorvâncias da amostra e do controle (branco) no término da reação respectivamente (ALVES, 2010; SOUSA, 2007). As análises foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais – CCET, UFMA.

4.13 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.13.1 Micro-organismos utilizados

As amostras utilizadas estão disponíveis na bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Clínica. Foram avaliadas amostras ATCC padrão e isolados clínicos de bactérias e fungos leveduriformes entre elas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 27010, *Escherichia coli* ATCC 35218, EAEC 17.2, EAEC 042, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Acinetobacter baumannii* e amostras clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*.

4.13.2 Padronização das suspensões bacterianas e fúngicas

Os micro-organismos foram inicialmente reativados a partir das suas culturas originais e mantidos em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) (Himedia®) em estufa à 37°C por 24 horas para bactérias e amostras fúngicas até 48 horas. Posteriormente, as amostras foram cultivadas em placas de Ágar Nutriente (Micromed®) a 37°C sob o mesmo tempo de incubação relatado anteriormente. Colônias isoladas foram então ressuspensas em 3 mL de solução fisiológica NaCl 0.89% estéril até atingir uma turbidez equivalente a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ bact/mL).

4.13.3 Análise antimicrobiana pela técnica de perfuração em ágar

O potencial antimicrobiano do extrato e das formulações farmacêuticas gel 5% (0,0695 mg/mL), solução 1% (0,0139 mg/mL) e sabonete íntimo 5% (0,0695 mg/mL) foram avaliados pela técnica de perfuração em meio Müller Hinton (Merk®). O meio foi perfurado com cilindros de (6mm) e em seguida foram colocados nos poços 50 µL dos produtos a serem testados. As placas foram incubadas à 37 °C por 24 horas para amostras bacterianas e fúngicas até 48 horas. Após incubação, com o auxílio de uma régua realizou-se medições correspondentes a média de três medidas diametralmente oposta ao halo de inibição do crescimento quando presente, com realizações dos testes em triplicata (OSTROSKY et al., 2008). Foram utilizados como controle positivo de bactérias cloranfenicol 0,02 mg/mL e para amostras fúngicas, nistatina 100.000 UI/MI suspensão (BRASIL, 2003).

4.13.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de macrodiluição em tubos de caldo BHI. Foram adicionados 1 mL de BHI nos tubos, em seguida colocou-se uma alíquota de 1 mL dos produtos no primeiro tubo e prosseguiu-se com as diluições seriadas. Posteriormente, foi acrescentado 20 µL da suspensão microbiana e 20 µL de CTT 1% (2,3,5-trifenil-tetrazólio), em seguida os tubos foram acondicionados em estufa bacteriológica à 37°C por 24 horas e até 48 para amostras fúngicas. A CBM foi avaliada através da obtenção da CIM, onde houve 99,9% de morte microbiana sobre a superfície do ágar. Foi utilizado como controle positivo para determinação da CIM 20 uL de suspensão bacteriana, 20uL de CTT 1% e 20 uL de cloranfenicol 0,02 mg/mL e para as amostras fúngicas o mesmo volume de suspensão e CTT 1% relatados anteriormente, acrescentado de 20uL de Nistatina 100.000 UI/MI. Como controle negativo para ambos os micro-organismos foi utilizado 20 uL das respectivas suspensões e 20 uL de CTT 1% como revelador indicativo de crescimento microbiano pela alteração de coloração para rosa (PHILLIPS, 1991;PIDDOCK, 1990).

4.14 Análise estatística

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.15 Análise da triagem fitoquímica

Dentre os metabólitos secundários analisados foi possível verificar que a classe de compostos químicos com maior representatividade encontrada no EH foram os compostos fenólicos. Além disso, houve presença de saponinas e alcaloides com menor intensidade como demonstrado na Tabela 3. Os compostos fenólicos encontram-se distribuídos em uma variedade de plantas medicinais e eles tem sido extensivamente investigado no direcionamento da atividade antimicrobiana. Flavonoides, flavonóis e taninos estão entre os grupos que tem se destacado com maior potencial de ação antimicrobiana (JOHNSON; MARIDASS; IRUDAYARAJ, 2008).

Tabela 3: Análise da triagem fitoquímica do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims

Metabólitos secundários	Espécie vegetal <i>Passiflora edulis</i> Sims
Cumarinas	++
Antocininas e Antocianidinas	-
Flavonas, Xantonas e Flavóis	-
Chalconas e Auronas	-
Flavonóides	++
Leucoantocianidinas	-
Catequinas	-
Flavanonas	++
Fenóis	+++
Taninos hidrolisáveis	-
Taninos condensados	+
Triterpenóides	-
Esteroides	-
Saponinas	+
Alcaloides	+

+++ fortemente positivo, ++ positivo, + fracamente positivo, - ausente.

Fonte: Elaborado pelo autor (2016)

Análises semelhantes foram realizadas através da triagem fitoquímica das folhas, caule e fruto de *Passiflora edulis* Sims, onde verificou-se a presença de flavonoides, taninos,

alcaloides e fenóis no fruto através de extração com metanol, hexano, acetato de etila e água. Esses resultados se assemelham com os achados nesse estudo utilizando solvente extrator hidroalcolico pela presença de flavonoides, taninos, alcaloides e fenóis com exceção apenas da ausência de saponinas não encontrada na amostra do fruto analisada (AKANBI; BODURIN; OLAYANJU, 2011).

Estudos relatam que na composição fitoquímica do extrato metanólico do pericarpo de *Passiflora edulis* Sims encontrou-se presença de saponinas, fenóis, flavonoides, triterpenos e esteroides (DZOTAM; TOUANI; KUETE, 2015). As análises encontradas neste estudo se assemelham aos da pesquisa anterior pela presença de saponinas, fenóis e flavonoides e se diferem pela ausência de triterpenos e esteroides. Pode se observar que apesar das análises fitoquímicas serem realizadas sobre diferentes partes de *Passiflora edulis* Sims através de extrações obtidas com solventes de polaridades distintas, todos os resultados encontrados demonstram a presença expressiva de compostos fenólicos como evidenciado neste estudo. As propriedades antimicrobianas de determinadas classes de polifenóis estão relacionadas à sua capacidade de suprimir fatores de virulência microbiano como biofilme, adesão e neutralização de toxinas bacterianas (DAGLIA, 2012).

4.16 Avaliação do teor de polifenóis totais e flavonoides

Na literatura, existem diversos trabalhos que descrevem o teor de polifenóis das espécies de *Passiflora* (RUDNICK et al., 2007; MODOGLIO, 2011; LUGATO et al., 2014; PINELLI et al., 2015). Contudo, sua maioria é relacionado as folhas de *P. alata*. (MODOGLIO, 2011). Avaliando a quantificação de polifenóis do extrato obtido a partir das sementes de *P. edulis*, foi constatado o teor de $480,1 \pm 4,833$ mg de equivalentes de ácido gálico por grama da amostra seca (mgAG)/g (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliação quantitativa dos constituintes químicos polifenóis (mgGA)/g e flavonoides totais (mgQE)/g do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims

Extratos Hidroalcolicos/ Relações de Hidromódulo	Polifenóis totais* (mgGA)/g	Flavonoides* (mgQE)/g
<i>Passiflora edulis</i> Sims	$480,1 \pm 4,833$	$12,4 \pm 0,014$

*Valores expressos como médias \pm erro padrão (teste one-way ANOVA), seguido de Tukey.
Fonte: Elaborado pelo autor (2016)

Esse valor pode ser considerado alto quando comparado ao teor das folhas de *P. alata*, descrito no trabalho de Rudnicki et al. (2007), onde a espécie de *P. alata* apresentou teor de $92.5 \pm 2,2$ µg/mg e *P. edulis* apresentou o teor de $171 \pm 1,6$ µg/mg. Estudos de Modoglio (2011) explica essa diferença afirmando que as sementes é o componente das partes aéreas de *Passiflora* que apresentam maior teor de compostos fenólicos.

Na quantificação do teor de flavonoides, observou-se que existe uma predominância de trabalhos relacionados as folhas das espécies de *Passiflora* (PETRY et al., 2001; BOTT; LABUZA; OLIVEIRA, 2010; MENDEZ et al., 2011; PINELI et al., 2015), dos quais pode se observar que estas variações dependem: do local onde elas foram cultivadas, como apresentado por Reimberg (2006), no qual demonstrou que o teor de flavonoides das folhas de *Passiflora incarnata* era de 26,1 mg/g no Brasil, enquanto na Itália era de 15,75 mg/g; meio extrativo, relatado por Pineli et al. (2015), onde observou-se que o extrato hidroalcolico apresentou teores de flavonoides superiores aos obtidos por infusão; de acordo com as espécies de *Passiflora*, conforme Petry et al. (2001) que demonstra que o teor observado para a espécie de *Passiflora edulis* era de 2,9% e 4,6% encontrados na espécie de *P. alata* e pelo processo de metodologia extrativa adequada, onde a porcentagem desta classe de metabólito secundário pode ser elevada, resultados evidenciados nas pesquisas de Bott, Labuza e Oliveira (2010), onde utilizaram o método spotted bed-dried e obtiveram um extrato com maior teor de flavonoides (10%).

Avaliando a quantificação de flavonoides dos extratos obtidos a partir das sementes do EH de *Passiflora edulis* Sims, foi constatado teor de $12,4 \pm 0,014$ mg de equivalentes de quercetina por grama da amostra seca (mgQE)/g (Tabela 4). Valor um pouco abaixo dos encontrados normalmente nas folhas das espécies, mas que pode ser explicado pelos fatores bióticos (temperatura, umidade e exposição à luz ultravioleta) que influenciam nos metabólitos primários e conseqüentemente na proteção do vegetal (INFANTE, 2013).

4.17 Avaliação do perfil cromatográfico do EB-HEtOH de *Passiflora edulis* Sims através de CCDC

Após a eluição do EB-HEtOH (extrato bruto hidroalcolico) em sistema hexano e acetato de etila (Hex:AcOEt) (80:20) foram verificados a presença de quatro manchas de compostos apolares sugestivas para óleo fixo na fração hexano (F-Hex) e para as outras duas frações, diclorometano (F-CH₂Cl₂) e acetato de etila (F- AcOEt), apenas o surgimento da aplicação não desenvolvida retidas na base inferior da placa (Figura 1).

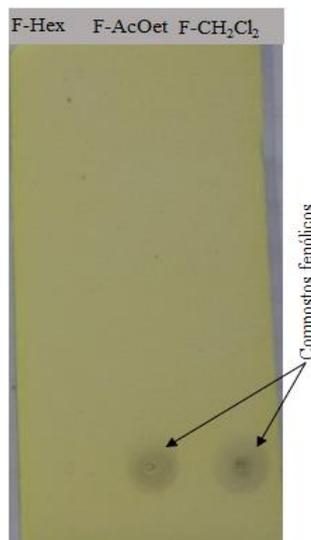
Figura 1: CCDC do fracionamento do EB-HEtOH das sementes de *Passiflora edulis* Sims com hexano e acetato de etila (80:20) revelada com vapores de iodo



Fonte: elaborado pelo autor (2016)

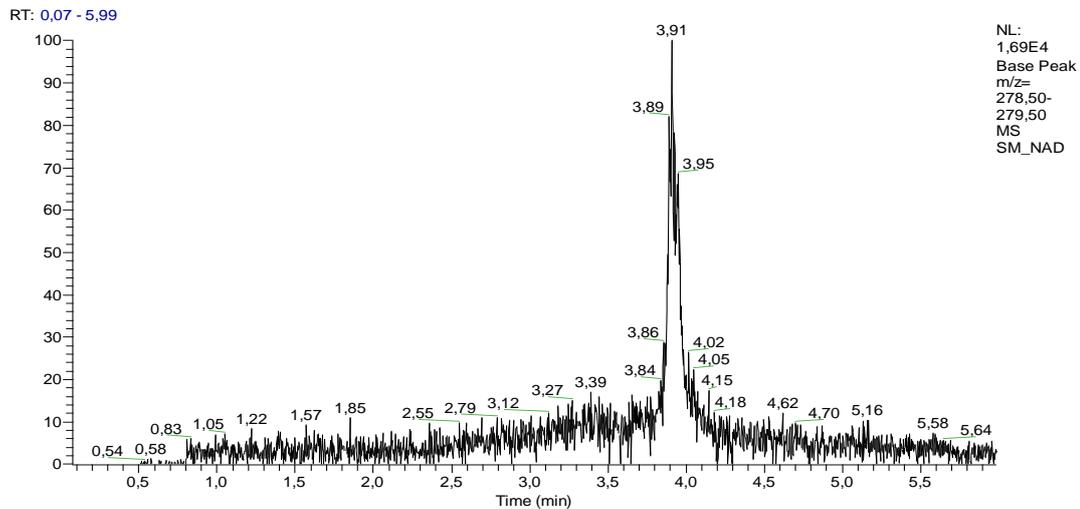
Foi possível identificar nas frações (F-CH₂Cl₂) e (F- AcOEt) a presença de compostos fenólicos na placa revelada com FeCl₃ (Figura 2). Obteve-se a purificação do surgimento de uma amostra referente a fração (F-CH₂Cl₂) após eluição em sistema acetato de etila, clorofórmio e metanol (AcOEt:CHCl₃:MeOH) (70:20:10) (Figura 3). Após essa certificação, providenciou-se o isolamento e a identificação desta substância.

Figura 2: Identificação de compostos fenólicos após aplicação de FeCl₃



Fonte: elaborado pelo autor (2016)

Figura 3: Cromatograma de composto fenólico obtido da fração (F-CH₂Cl₂) a partir da fase móvel AcOEt:CHCl₃: MeOH (70:20:10) através de ESI-IT-MS



Fonte: Elaborado pelo autor (2016)

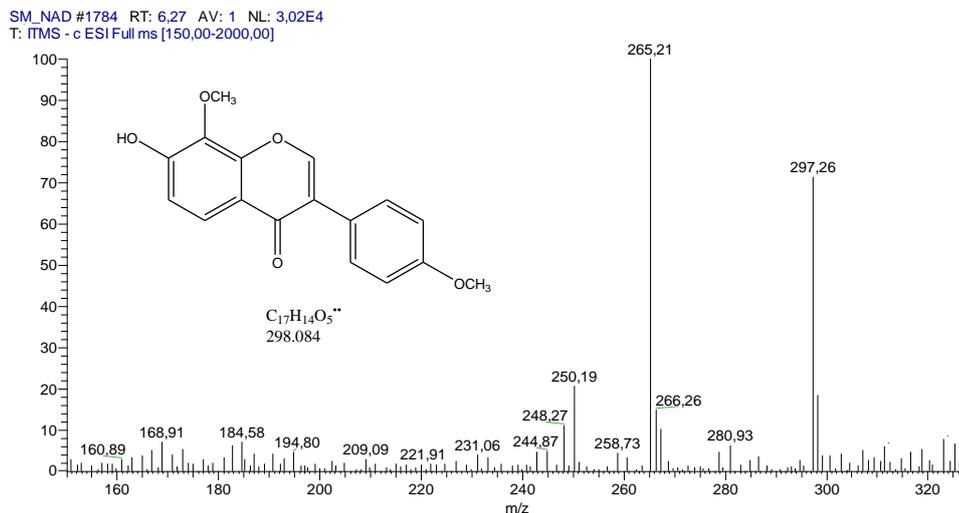
Comparação cromatográfica por CCD do extrato etanólico e de suas frações obtidas de diferentes partes de *Passiflora alata* Curtis através de fase móvel acetato de etila, acetona, ácido acético e água (AcOEt: CH₃COCH₃:CH₃COOH:H₂O) (60:20:10:10) demonstraram que o pericarpo e as sementes são mais ricos em compostos flavonoídicos quando comparadas com a polpa e as folhas de *Passiflora alata* Curtis. A autora relata que os metabólitos secundários mais descritos para o gênero de *Passiflora* são os flavonoides, as saponinas e os alcaloides, sendo a presença dos alcaloides uma controversa (ALVES, 2013). Os resultados desta pesquisa corroboram com os achados neste estudo para a espécie de *Passiflora edulis* Sims onde houve forte presença de compostos fenólicos com presença de flavonoides nas sementes.

As sementes de *Passiflora edulis* Sims são ricas em óleos que podem ser utilizados pelas indústrias de alimentos e principalmente pela indústria farmacêutica na área de cosméticos e perfumaria (MARQUES, 2012). De acordo com os dados cromatográficos sobre a composição química do óleo de *Passiflora edulis* Sims estudos demonstram que há grande quantidade de compostos insaturados 84,53% tendo como ácido graxo marjoritário o linoleico com 66,74% (ALVES, 2013). As análises cromatográficas realizadas nesse estudo evidenciaram a presença sugestiva de óleo fixo a partir da eluência em sistema hexano e acetato de etila (80:20) na F-Hex reveladas com vapores de iodo, resultado que configura o possível aparecimento de óleo nas sementes de *Passiflora edulis* Sims.

4.18 Caracterização estrutural do CF obtido da F-CH₂Cl₂ através de LC- ESI-MSⁿ

Com base nos resultados obtidos foi possível verificar vários picos, dentre eles vale destacar dois de maior importância: 297,2 e 265,2 (pico base). O perfil do espectro de massa do referido composto foi semelhante ao padrão da molécula de flavonoide correspondente a seguinte fórmula C₁₇H₁₄O₅ (Isoflavona). Observou-se que o resultado do pico base seria justamente a perda do fragmento m/z 32 referente ao grupo metoxila (OCH₃) localizado na posição oito (C-8) como também o fragmento m/z 250,1 resultando da perda de CH₃ da metoxila descrita anteriormente conforme Figura 4.

Figura 4: Principais fragmentações observadas do CF por ESI-IT-MSⁿ das sementes de *Passiflora edulis* Sims



Fonte: elaborado pelo autor (2016)

As propriedades antimicrobianas têm sido relatadas em diferentes trabalhos científicos envolvendo classes de flavonoides. Estudos de Cushnie e Lamb (2011), retratam que a atividade antimicrobiana do própolis foram atribuídas principalmente aos seus flavonoides galangina e pinocebrim. No entanto, a maioria das pesquisas estão apontando maiores direcionamentos destes na atividade antifúngica. Segundo Arif et al. (2009), a atividade antifúngica deve-se provavelmente à capacidade de os flavonoides formar complexos com proteínas solúveis presentes nas paredes das células fúngicas. Salas et al. (2011), complementa os estudos de Arif et al. (2009), afirmando que a natureza lipofílica de determinadas classes de flavonoides é capaz de romper a membranas dos fungos.

A atividade antifúngica de diferentes tipos de flavonas purificadas a partir de cinco plantas medicinais da família *Moraceae* foram descritas como potentes antifúngicos contra *C. albicans* e *S. cerevisiae* (Arif et al., 2009). Pesquisa realizada Serpa et al. (2012) demonstra a capacidade antifúngica da baicaleína constituinte da flavona *Scutellaria baicalensis* contra espécies de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. Destaca-se também um papel promissor relativamente ao sinergismo desta flavona com fluconazol contra infecções por *Candida*.

4.19 Análise da atividade antioxidante

Todas as diferentes concentrações avaliadas do EH apresentaram atividade antioxidante superior quando comparadas com o padrão de antioxidante trolox ($p < 0,05$). O EH foi capaz de apresentar potencial antioxidante quinze vezes maior (0,0096 g/mL) na variável de concentração máxima e seis vezes maior na mínima diluição (0,0006 g/mL) que o equivalente trolox (mg/g) pela curva de comparação (Tabela 5).

Tabela 5: Atividade antioxidante em diferentes concentrações do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims

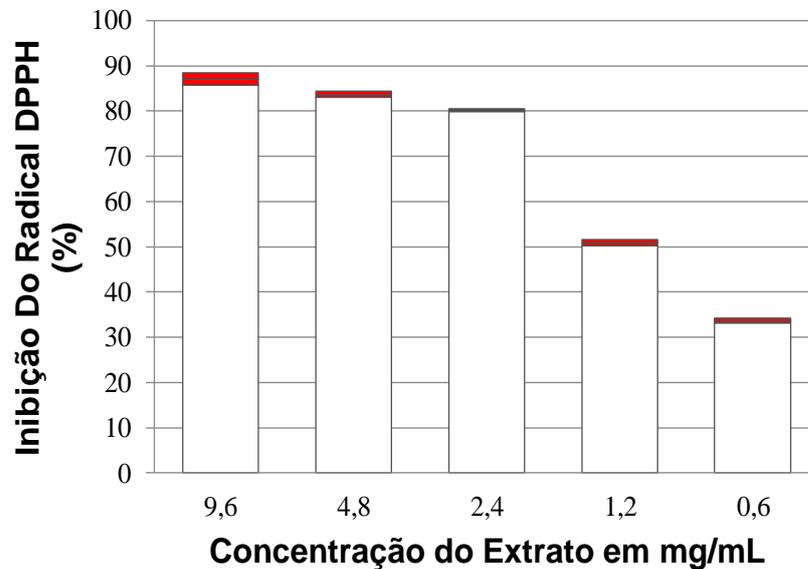
Extrato (g/ml)	ET (mg/g)	Cv (%)
0,0096	15699,97 ± 238,55a*	1,519443
0,0048	15080,37 ± 127,32b*	0,844313
0,0024	14450,27 ± 65,58c*	0,453847
0,0012	9167,94 ± 126,02d*	1,374573
0,0006	6080,46 ± 94,515e*	1,554406

ET- equivalente trolox (antioxidante padrão)/mg/g do extrato; CV- coeficiente de variação (%); *médias seguidas por letras diferentes na coluna, diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores expressos como médias ± erro padrão (teste one-way ANOVA), seguido de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor (2016)

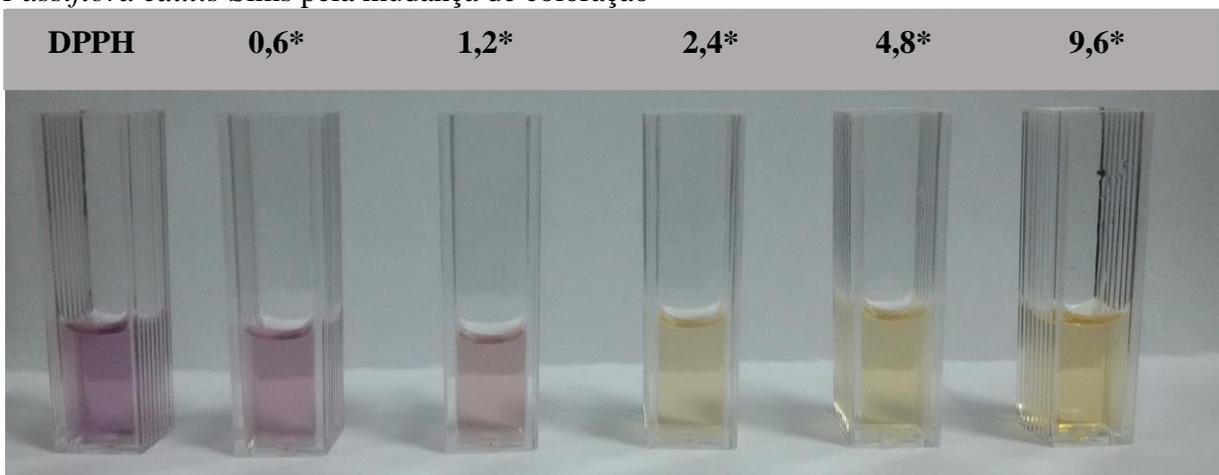
A capacidade de redução do radical DPPH pelo EH chegou ao nível de 87% (9,6 mg/mL) apresentando forte configuração no sequestro desse radical para promoção da atividade antioxidante (Figura 5). A mudança de coloração do sequestro do radical DPPH em diferentes concentrações do EH de *Passiflora edulis* Sims pode ser verificado na Figura 6.

Figura 5: Porcentagem de inibição do radical DPPH em diferentes concentrações do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims



Fonte: elaborado pelo autor (2016)

Figura 6: Redução do radical DPPH em diferentes concentrações do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims pela mudança de coloração



*diferentes concentrações do EH de *Passiflora edulis* Sims (mg/mL) sobre a redução do radical DPPH acompanhada pela mudança de coloração do violeta intenso para o amarelo claro.

Fonte: elaborado pelo autor (2016)

A investigação da composição química dos extratos de *Passiflora* tem demonstrado que os compostos fenólicos são os constituintes marjoritários da espécie de *Passiflora edulis* (PEREIRA et al., 2004). A capacidade dos compostos fenólicos em agir como antioxidante *in vitro* deve-se a sua habilidade de doar átomos de hidrogênio e é dependente de suas estruturas químicas (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

A capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC), foi avaliada a partir do extrato hidroalcolico das folhas de *P. edulis* e *P. alata* em concentrações do extrato que variavam de 0,1, 1 e 10 mg/mL. Verificou-se que ambos os extratos apresentaram atividade antioxidante significativa apenas nas concentrações de 1 e 10 mg/mL (RUDNICKI et al., 2007). Concentrações tão baixas como 0,6 mg/mL do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims promoveram capacidade antioxidante seis vezes maior que o padrão de equivalente trolox.

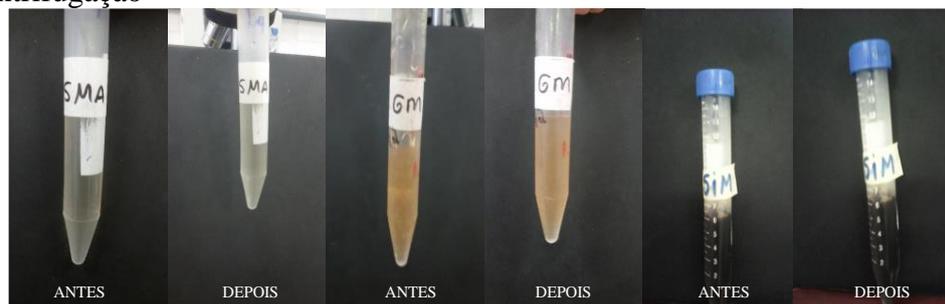
O potencial antioxidante foi observado através de concentrações de 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL do extrato hidroalcolico e aquoso das folhas de *Passiflora edulis* Sims e do suco do fruto utilizando hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidante padrão. Os resultados demonstraram que o extrato hidroalcolico apresentou 1,46 vezes maior atividade antioxidante em relação ao extrato aquoso e o suco promovendo a eliminação de 50% dos radicais de DPPH na concentração mais baixa de 0,1 mg/mL. Os autores relatam que o resultado encontrado pode ser atribuído a presença de flavonoides no extrato hidroalcolico que são capazes de transferir elétrons ao radical DPPH e estabilizá-lo (OSMA et al., 2013).

As análises identificadas nesta pesquisa demonstraram que o EH eliminou 35% do radical DPPH na concentração de 0,6 mg/mL (Figura 6), resultados que diferem da pesquisa anterior, onde o extrato apresentou melhor inibição em concentrações mais baixas de 0,1 mg/mL, no entanto, deve-se levar em consideração os diferentes parâmetros adotados e a diferença dos antioxidantes utilizados como padrão de comparação, solventes e fatores externos.

4.20 Análise dos testes de estabilidade das formulações farmacêuticas

Todas as amostras seguiram um padrão aceitável de estabilidade pelo teste primário de centrifugação, nenhum dos produtos avaliados apresentaram quaisquer alterações ou mudança de fase após três dias de manipulados (Figura 7).

Figura 7: Teste de estabilidade das preparações obtidas do EH de *Passiflora edulis* Sims pelo método de centrifugação



solução 5% (SMA); gel 5% (GM); sabonete íntimo 5% (SIM).

Fonte: elaborado pelo autor (2016)

No que diz respeito às características sensoriais como cor e odor, o EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims possuiu cor castanho claro fato que explica a coloração da solução e o do gel em amarelo claro e odor peculiar do maracujá, apenas o sabonete íntimo demonstrou coloração mais forte em relação ao gel e a solução, apresentando fragrância característica de *Passiflora edulis* Sims.

O estudo de estabilidade fornece indicativos sobre o comportamento do produto em determinado espaço de tempo frente a condições ambientais a que este possa está submetido, desde a fabricação até o término da validade (BRASIL, 2004). Variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte, assim como os constituintes presentes na formulação sejam eles compostos ativos ou não, podem influenciar na estabilidade do produto (ISAAC, 2009). Os extratos vegetais são incorporados em diferentes preparações cosméticas e dependendo da classe química de seus ativos, são os responsáveis pela atividade do produto. Podem ou não alterar a forma cosmética e o comportamento da preparação conforme estudos realizados por Archondo (2003).

4.21 Avaliação do controle de qualidade microbiológico do extrato e das formulações farmacêuticas

Foram avaliados os padrões de qualidade microbiológicos do extrato e das formulações farmacêuticas observando ausência de contaminantes para o extrato, a solução e o sabonete íntimo. Com exceção apenas para o gel onde houve surgimento de colônias em meio PCA (Plate Count Agar) e em meio Sabourad através do crescimento sugestivo de fungo filamentosos *Aspergillus* spp. valor $\leq 10^3$ UFC/mL (Tabela 6).

Tabela 6: Avaliação do controle de qualidade microbiológico do EH e das formulações obtidas das sementes de *Passiflora edulis* Sims

Parâmetros	Análise presuntiva	Micro-organismos heterotróficos	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes	Análise fúngica
Meio de cultura	Lauryl	Plate Count Agar	Verde brilhante	EC caldo	Sabourad
Extrato	-	-	-	-	-
Gel	-	+	-	-	+
Solução	-	-	-	-	-
Sabonete íntimo	-	-	-	-	-

- ausência de crescimento microbiano; + presença de crescimento microbiano

Fonte: elaborado pelo autor (2016)

Esse resultado pode ser atribuído a exposição do gel no ambiente laboratorial ou pelo processo de manipulação e característica da própria formulação através de seus excipientes. Considerando que a formulação cosmética analisada possui característica aquosa e que produtos com maior quantidade de água favorecem o crescimento microbiano, pode-se presumir que a água utilizada na formulação do gel ou as condições de higiene do local da produção ou do manipulador constituíram prováveis fontes de contaminação.

A avaliação da qualidade microbiológica é necessária para determinar a carga microbiana aceitável e verificação de micro-organismos considerados de risco para o usuário de fitoterápicos. A qualidade microbiológica não só de fitoterápicos, mas de medicamentos e cosméticos é definida por padrões microbianos descritos em compêndios oficiais e normas regulamentadoras que apresentam limites máximos de presença de micro-organismos no produto e dentre esses, ausência de alguns patógenos (FREITAS, 2007; YAMAMOTO et al., 2004). Segundo Pinto, Kanero e Pinto (2015), as plantas medicinais são mais propícias a contaminação microbiana e dentre os micro-organismos mais encontrados estão: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Bacillus* e ocasionalmente *Staphylococcus* spp. e *Micrococcus*, relata ainda que, matérias-primas em geral empregadas nas formulações cosméticas são importantes fontes de contaminação microbiana e por isso devem ser controladas.

Os limites de contaminação microbiológica são estipulados pela Farmacopeia Brasileira para a qualidade microbiológica de formulações fitoterápicas de até $\leq 10^3$ UFC/mL para fungos e 3×10^2 UFC/mL para bactérias (ANVISA, 2010; SILVA et al., 2014). Nesse estudo pode ser verificado a presença de crescimento fúngico característico de *Aspergillus* spp. na formulação do gel com valor $\leq 10^3$ UFC/mL obedecendo os critérios estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira e ausência de qualquer contaminante de origem bacteriana no extrato nas formulações, no geral as amostras mantiveram padrões aceitáveis de controle de qualidade microbiológico.

Avaliações microbiológicas realizadas em xampus e cremes condicionadores infantis por Rosa et al. (2015), demonstrou que nenhuma das amostras analisadas com ou sem a inativação de conservantes, apresentou crescimento de micro-organismos patogênicos. Todas cumpriram as recomendações da Farmacopeia Brasileira e RDC/481/99, entretanto 50% dos xampus e 30% dos condicionadores apresentaram crescimento de fungos filamentosos e leveduras não patogênicas. Os resultados desta pesquisa corroboram com os achados de Rosa et al. (2015), pela presença de fungo filamentoso na formulação do gel com inativação de conservantes.

Em um estudo que objetivou avaliar contaminantes microbiológicos de produtos comercializados em farmácia de manipulação entre eles: cinco amostras de xaropes, três loções hidratante e um hidratante na forma de emulsão, observou-se que 45,5% das amostras estudadas apresentaram valores dentro dos limites de controle microbiológico especificados pela Farmacopeia. No entanto, 54,5% tiveram seus padrões de qualidade reprovados com carga microbiana $\geq 3 \times 10^2$ UFC/mL pela presença de *S. aureus* e *Salmonella* spp. As amostras que estavam em conformidade com os protocolos farmacopeicos tiveram crescimento de fungos filamentosos com crescimento de $\leq 10^3$ UFC/mL dentre os gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Microsporium*, *Epidermophyton* e *Phialophora* (MEDEIROS, 2010). Assim como o referido estudo, foi possível verificar presença de fungo filamentoso do gênero *Aspergillus* no gel analisado e, resultados distintos pela ausência de bactérias patogênicas em todas as formulações avaliadas na presente pesquisa.

4.22 Análise da atividade antimicrobiana pelas técnicas de perfuração e macrodiluição sobre micro-organismos gram-positivos

Verificou-se a atividade antimicrobiana significativa do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims sobre amostras padrão e isolados clínicos de bactérias gram-positivas: *S. aureus* ATCC 25923 (9,8 mm), *E. faecalis* ATCC 29212 (9,76 mm) com menor atividade inibitória das amostras padrão pelo extrato em comparação aos seus isolados clínicos de *E. faecalis* (10,50 mm) ($p < 0,001$) (Figura 8) e *S. aureus* (10,17 mm). Houve ainda ação do extrato contra *S. saprophyticus* (9,93mm), *S. pyogenes* (24,97mm), *S. haemolyticus* (10,67 mm) e *C. diphtheriae* ATCC 27010 (11,87 mm) (Tabela 7).

Tabela 7: Atividade antimicrobiana *in vitro* do EH e das formulações pela técnica de perfuração em ágar sobre micro-organismos gram-positivos de interesse clínico

Micro-organismos	Extrato ¹	Gel ²	Solução ²	CP ³	CN ⁴
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	9,8 ± 0,16*	-	-	39,60 ± 0,30	0
<i>S. aureus</i>	10,17 ± 0,44*	-	-	39,60 ± 0,30	0
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	9,76 ± 0,14*	-	-	19,60 ± 0,40	0
<i>E. faecalis</i>	10,50 ± 0,33*	-	-	19,67 ± 0,33	0
<i>S. saprophyticus</i>	9,93 ± 0,06*	-	-	34,97 ± 0,03	0
<i>S. pyogenes</i>	24,97 ± 0,03*	-	-	39,83 ± 0,16	0

<i>S. haemolyticus</i>	10,67 ± 5,3*	-	-	39,93 ± 0,06	0
<i>C. diptheriae</i> ATCC 27010	11,87 ± 0,06*	-	-	34,67 ± 0,33	0

*variação estatística do grupo ¹(mm) em relação ao grupo ³(mm) p<0,05; ¹halo de inibição do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims 9,6 mg/mL (mm); ²-ausência de atividade antimicrobiana; ³CP-controle positivo-Cloranfenicol 0,02 mg/mL (mm); ⁴CN- controle negativo, álcool 70% - extrato, base do gel e base da solução (mm). Valores expressos como médias ± erro padrão (teste one-way ANOVA), seguido de Tukey.
Fonte: elaborado pelo autor (2016)

Figura 8: Zona de inibição do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims sobre *E. faecalis* pela técnica de perfuração em ágar



Fonte: elaborado pelo autor (2016)

As análises de macrodiluição confirmaram que o extrato apresentou resposta mais eficaz contra os isolados clínicos de *S. aureus* e *E. faecalis* com CBM de 0,6 mg/mL para ambas as espécies, demonstrando assim melhor ação para as amostras clínicas em relação as cepas padrão. Pôde-se observar que diante de bactérias Gram-positivas, além das cepas referidas anteriormente, o EH apresentou atividade antimicrobiana mais expressiva frente às amostras clínicas de *S. saprophyticus* e *C. diptheriae* ATCC 27010 apresentando CIM de 0,3 mg/mL e CBM 1,2 mg/mL (Tabela 8).

Extratos obtidos das folhas de *Passiflora edulis* Sims, demonstraram maior potencial antimicrobiano da fração clorofórmica sobre *S. aureus* com maior zona de inibição de 10 mm quando comparado com *E.coli*, *P. aeruginosa* e *Serratia* spp. (JOHNSON; MARIDASS; IRUDAYARAJ, 2008). A avaliação antimicrobiana do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims foi significativa para o isolado clínico de *S. aureus* com formação de halo de inibição de

10,17 mm (Tabela 7). Esse resultado demonstra que diferentes frações orgânicas extraídas de partes diferentes de *Passiflora edulis Sims* podem provocar atividade antimicrobiana contra *S. aureus*.

Pesquisas realizadas constataram a inibição de bactérias gram-positivas através da polpa de *Passiflora edulis* devido a presença de uma substância chamada Passicol, no entanto, a mesma não demonstrou nenhuma inibição em relação as bactérias Gram-negativas (NICHOLLS; BIRNER, 1973; MOHANASUNDARI et al., 2007). Diferentemente do presente estudo foi observado a inibição tanto de bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas pelo EH de *Passiflora edulis Sims*.

Ao analisar as formulações farmacêuticas testadas, verificou-se que o gel não demonstrou eficácia no teste de perfuração em ágar. Diferentemente, no teste de macrodiluição apresentou melhor ação, principalmente frente a cepa de *C. diphtheriae* ATCC 27010 com valores representados por CIM de 0,008 mg/mL e CBM de 0,017 mg/mL (Figura 9), seguido de *S.aureus* ATCC 25923 com a CIM de 0,017 mg/mL e CBM de 0,034 mg/mL (Tabela 8).

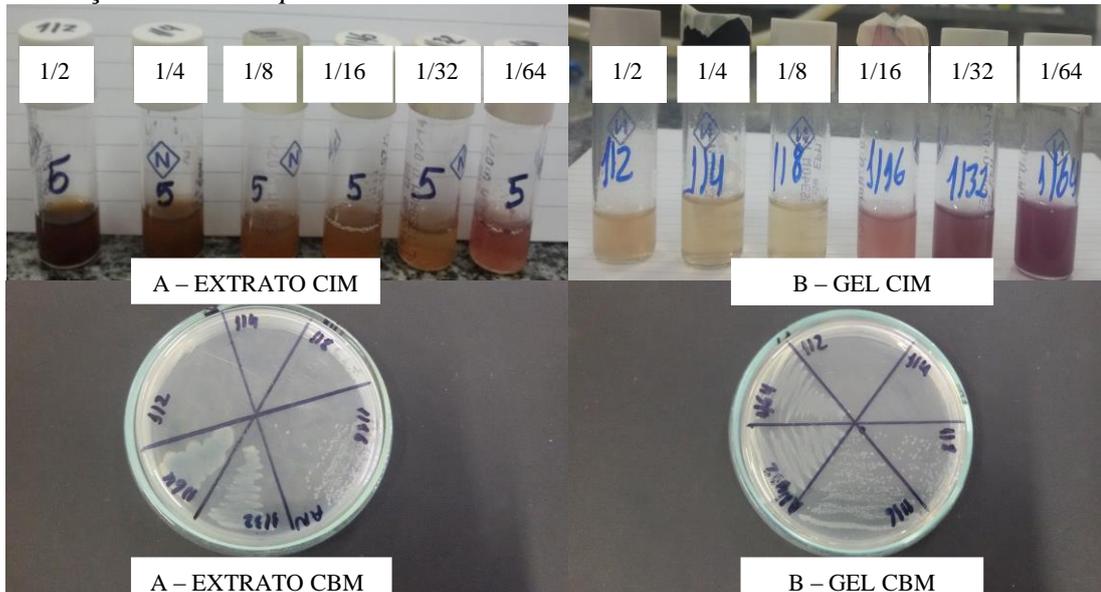
Tabela 8: Análise da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do EH e das formulações sobre bactérias gram-positivas de interesse clínico

Micro-organismos	Extrato ¹		Solução ²		Gel ³		CN ⁴
	CIM	CBM	CIM	CIM	CBM	CIM	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1,2	2,4	-	-	0,034	0,017	0
<i>S. aureus</i>	1,2	0,6	-	-	-	-	0
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,6	1,2	-	-	-	-	0
<i>E. faecalis</i>	0,3	0,6	-	-	-	-	0
<i>S. saprophyticus</i>	0,3	1,2	-	-	-	-	0
<i>S. pyogenes</i>	0,6	1,2	-	-	-	-	0
<i>S. haemolyticus</i>	0,6	1,2	-	-	-	-	0
<i>C. diphtheriae</i> ATCC 27010	0,3	1,2	-	-	0,008	0,017	0

¹CIM e CBM do EH das sementes de *Passiflora edulis Sims* (mg/mL); ²-ausência de atividade antimicrobiana da solução 5%; ³CIM e CBM do gel 5%; (mg/mL); ⁴CN-controle negativo, álcool 70% - extrato, base da solução e base do gel.

Fonte: elaborado pelo autor (2016)

Figura 9: Verificação da CIM e CBM das sementes de *Passiflora edulis* Sims pela técnica de macrodiluição sobre *C. diptheriae* ATCC 27010



Fonte: elaborado pelo autor (2016)

4.23 Análise da atividade antimicrobiana pelas técnicas de perfuração e macrodiluição sobre micro-organismos gram-negativos

Os resultados demonstraram que o EH apresentou atividade antimicrobiana significativa contra bactérias Gram-negativas avaliadas independentemente de suas origens. As amostras de *E. coli* ATCC 35218 (13,97 mm) e os sorotipos: *EAEC* 17.2 (14,60 mm) e *EAEC* 042 (11,33 mm) exibiram sensibilidade ao EH (Tabela 9). No entanto, o EH demonstrou maior potencial bactericida frente a amostra *EAEC* 042, sendo necessário apenas 0,3 mg/mL e 1,2 mg/mL para inibir o crescimento e provocar a morte, respectivamente, da referida cepa (Figura 10) (Tabela 9).

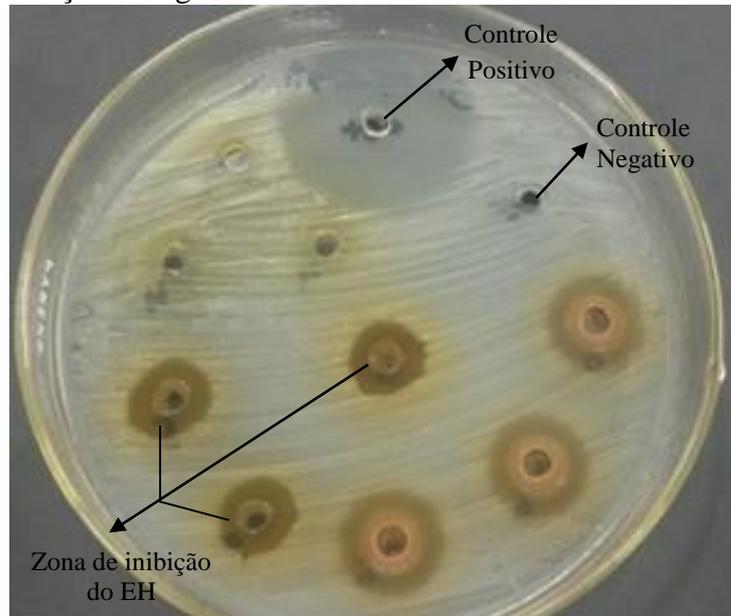
Tabela 9: Atividade antimicrobiana *in vitro* do EH e das formulações pela técnica de perfuração em ágar sobre micro-organismos gram-negativos de interesse clínico

Micro-organismos	Extrato ¹	Gel ²	Solução ²	CP ³	CN ⁴
<i>E. coli</i> ATCC 35218	13,97 ± 2,01*	-	-	28,90 ± 0,10	0
<i>EAEC</i> 17.2	14,60 ± 0,30*	-	-	22,33 ± 0,33	0
<i>EAEC</i> 042	11,33 ± 0,33*	-	-	15,57 ± 0,29	0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	4,93 ± 0,06	-	-	40,27 ± 0,37	0
<i>K. pneumoniae</i>	7,67 ± 0,33	-	-	31,67 ± 0,66	0

<i>Salmonella</i> spp.	10,67±0,33*	-	-	37,33 ± 0,33	0
<i>S. marcescens</i>	11,67 ± 0,33*	-	-	27,97 ± 0,03	0
<i>M. morganii</i>	12,67 ± 0,33*	-	-	34,67 ± 0,88	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	11,93 ± 0,03*	-	-	21,67 ± 0,33	0
<i>A. baumannii</i>	15 ± 0,57*	-	-	39,63 ± 0,31	0

*variação estatística do grupo ¹(mm) em relação ao grupo ³(mm) p<0,05; ¹halo de inibição do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims 9,6 mg/mL (mm); ²-ausência de atividade antimicrobiana; ³CP-controle positivo-Cloranfenicol 0,02 mg/mL (mm); ⁴CN- controle negativo, álcool 70% - extrato, base do gel e base da solução (mm). Valores expressos como médias ± erro padrão (teste one-way ANOVA), seguido de Tukey
Fonte: elaborado pelo autor (2016)

Figura 10: Zona de inibição do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims sobre *EAEC* 042 pela técnica de perfuração em ágar



Fonte: elaborado pelo autor (2016)

Não houve atividade antimicrobiana significativa para a amostra padrão e isolado clínico de *K. pneumoniae* pela técnica em ágar (Tabela 8). Entretanto, os testes quantitativos de macrodiluição revelaram potencial antimicrobiano do EH contra a amostra clínica de *K. pneumoniae* com CIM de 0,6 mg/mL e CBM 1,2 mg/mL (Tabela 9). Também foi possível constatar atividade antimicrobiana contra *Salmonella* spp. (10,67 mm), *S. marcescens* (11,67 mm), *M. morganii* (12,67 mm) pela técnica de perfuração em ágar (Tabela 9).

Do mesmo modo, os representantes dos bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) avaliados apresentaram sensibilidade ao EH: *A. baumannii* (15 mm) e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (11,93 mm) (Tabela 9). Ressalta-se que dentre todas as amostras de

bactérias Gram-negativas analisadas o EH teve melhor ação antimicrobiana contra *M. morgani*, quando somente 0,3 mg/mL e 0,6 mg/mL foi necessário para constatar o efeito inibitório e bactericida, respectivamente (Tabela 10) (Figura 11). Apesar de se verificar resultados tão significativos com a utilização do EH, nenhuma das formulações farmacêuticas avaliadas apresentaram atividade antimicrobiana sobre os micro-organismos gram-negativos pelas metodologias aplicadas.

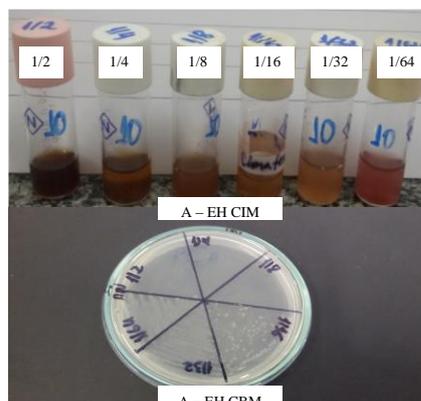
Tabela 10: Análise da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do EH e das formulações sobre bactérias gram-negativas de interesse clínico

Micro-organismos	Extrato ¹		Solução ²		Gel ²		CN ³
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	
<i>E. coli</i> ATCC 35218	0,6	1,2	-	-	-	-	0
EAEC 17.2	0,6	2,4	-	-	-	-	0
EAEC 042	0,3	1,2	-	-	-	-	0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	2,4	1,2	-	-	-	-	0
<i>K. pneumoniae</i>	0,6	1,2	-	-	-	-	0
<i>Salmonella</i> spp.	0,6	1,2	-	-	-	-	0
<i>S. marcescens</i>	0,3	1,2	-	-	-	-	0
<i>M. morgani</i>	0,3	0,6	-	-	-	-	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,3	1,2	-	-	-	-	0
<i>A. baumannii</i>	0,6	1,2	-	-	-	-	0

¹CIM e CBM do EH das sementes do *Passiflora edulis* Sims (mg/mL);²-ausência de atividade antimicrobiana;³CN-controle negativo, álcool 70% - extrato, base da solução e base do gel.

Fonte: elaborado pelo autor (2016)

Figura 11: Verificação da CIM e CBM das sementes de *Passiflora edulis* Sims sobre *M. morgani* pela técnica de macrodiluição



Fonte: elaborado pelo autor (2016)

Diferentes avaliações antimicrobianas foram realizadas contra isolados clínicos de *E.coli*, *P. aeruginosa*, *K. aerogenes* e *Serratia* spp. a partir das folhas de *Passiflora edulis* Sims, pela extração com diferentes solventes orgânicos e o extrato etanólico mostrou maior eficácia sobre todos os micro-organismos avaliados contra *E. coli* com halo de inibição de (10 mm) (JOHNSON; MARIDASS; IRUDAYARAJ, 2008). No presente estudo, foi possível identificar que o EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims apresentou maior efeito inibitório frente as amostras de *E. coli* avaliadas, obtendo maior halo de inibição para o sorotipo EAEC 042 (11,33 mm) (Tabela 9) (Figura 10).

Estudos realizados verificaram o potencial antimicrobiano do extrato hidroalcólico das folhas, caules, casca, polpa e sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. contra *E. coli* através de combinações dos extratos com amicacina, gentamicina, ampicilina, benzilpenicilina e oxacilina. Os extratos demonstraram aumento do potencial antimicrobiano apresentando melhores respostas quando combinado com drogas convencionais utilizadas no tratamento de infecções provocadas por *E. coli* (SIEBRA et al., 2016). Extrato clorofórmico de *Passiflora edulis* Sims apresentou maior atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *P. aeruginosa* com halos de inibição de 11 mm e 12 mm respectivamente, demonstrando forte atividade antimicrobiana para o grupo de bactérias Gram-negativas especialmente enterobactérias e os BGN-NF (RIPA et al., 2009).

O grupo das enterobactérias especialmente *E.coli* tem sido extensivamente relatado em diversos estudos envolvendo as espécies de *Passiflora* como forte potencial antimicrobiano para investigação de novos fármacos a serem utilizados no tratamento dessas infecções. Além disso, é possível verificar atividade antimicrobiana frequentemente relatada de extratos derivados das espécies de *Passiflora* contra os BGN-NF principalmente para a amostra de *P. aeruginosa*.

Apesar de constatar resultados tão significativos com a utilização do EH, nenhuma das formulações farmacêuticas avaliadas apresentaram atividade antimicrobiana sobre os micro-organismos gram-negativos pelas metodologias aplicadas.

4.24 Análise da atividade antimicrobiana pelas técnicas de perfuração e macrodiluição sobre fungos de interesse clínico

Verificou-se atividade antifúngica expressiva do EH e do sabonete íntimo contra leveduras do gênero *Candida*. O isolado clínico de *C. tropicalis* foi a amostra clínica que apresentou maior sensibilidade ao EH, apresentando 14,93 mm de diâmetro na zona de

inibição. Contudo, o resultado mais significativo de acordo com a estatística foi constatado diante da espécie *C. albicans* ao avaliar a eficácia do sabonete íntimo, obtendo-se 12,67 mm de diâmetro no perfil de sensibilidade, retratando $p < 0,001$ (Tabela 11) (Figura 12).

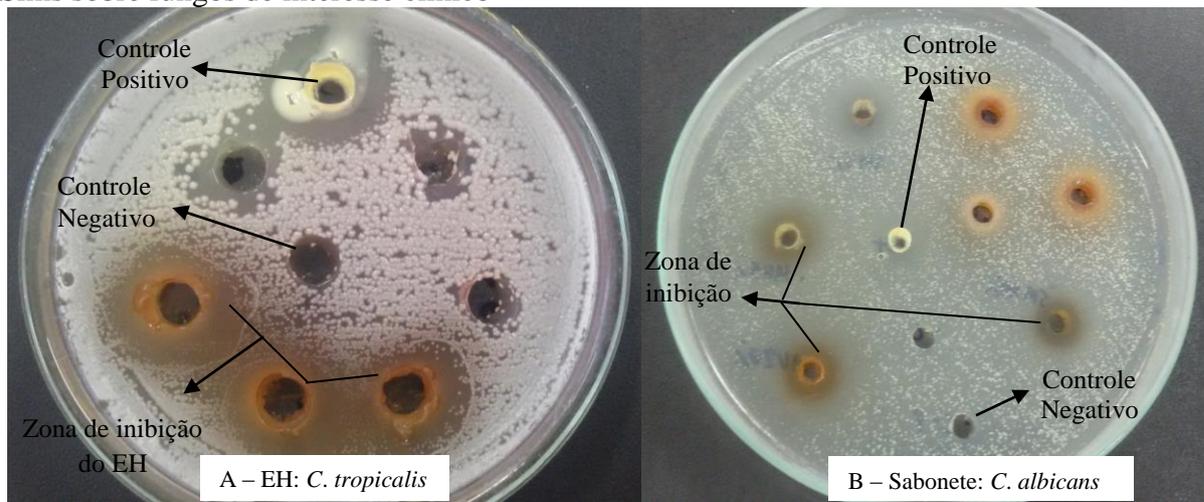
Tabela 11: Atividade antimicrobiana *in vitro* do EH e das formulações pela técnica de perfuração em ágar sobre fungos de interesse clínico

Micro-organismos	Extrato ¹	Gel ²	Solução ²	Sabonete ³	CP ⁴	CN ⁵
<i>C. albicans</i>	13,97±0,03*	-	-	12,67 ± 0,88*	19,67 ± 0,33	0
<i>C. tropicalis</i>	14,93 ± 0,03*	-	-	11,33 ± 0,66*	25,33 ± 0,33	0
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	34,67 ± 0,33	0
<i>C. glabrata</i>	9,93 ± 0,06*	-	-	9,55 ± 0,28*	29,33± 0,33	0

*variação estatística do grupo ¹(mm) em relação ao grupo ⁴(mm) $p < 0,05$; ¹halo de inibição do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims 9,6 mg/mL (mm); ²-ausência de atividade antimicrobiana; ³halo de inibição do sabonete íntimo 5% (mm); ⁴CP-controle positivo-Nistatina 100.000 UI/MI (mm); ⁵CN- controle negativo, álcool 70% - extrato, base do gel, base da solução e base do sabonete íntimo (mm). Valores expressos como médias ± erro padrão (teste one-way ANOVA), seguido de Tukey

Fonte: elaborado pelo autor (2016)

Figura 12: Zona de inibição do EH e do sabonete íntimo das sementes de *Passiflora edulis* Sims sobre fungos de interesse clínico



Fonte: elaborado pelo autor (2016)

Além disso, constatou-se também efeito inibitório do EH e sabonete íntimo contra *C. glabrata* e resistência da amostra de *C. parapsilosis* sobre todos os outros produtos avaliados. Não se averiguou atividade antifúngica do gel e da solução pela técnica de perfuração em ágar contra as leveduras analisadas (Tabela 11).

Nos testes de macrodiluição com exceção da solução, o extrato, o gel e o sabonete íntimo demonstraram ação antifúngica. A amostra de *Candida albicans* apresentou maior sensibilidade ao extrato e a melhor ação obtida pelo sabonete íntimo foi para o isolado clínico

de *C. tropicalis* (Figura 13). O gel apresentou maior atividade contra *Candida glabrata* e a estirpe de *C. parapsilosis* apresentou-se novamente resistente (Tabela 12).

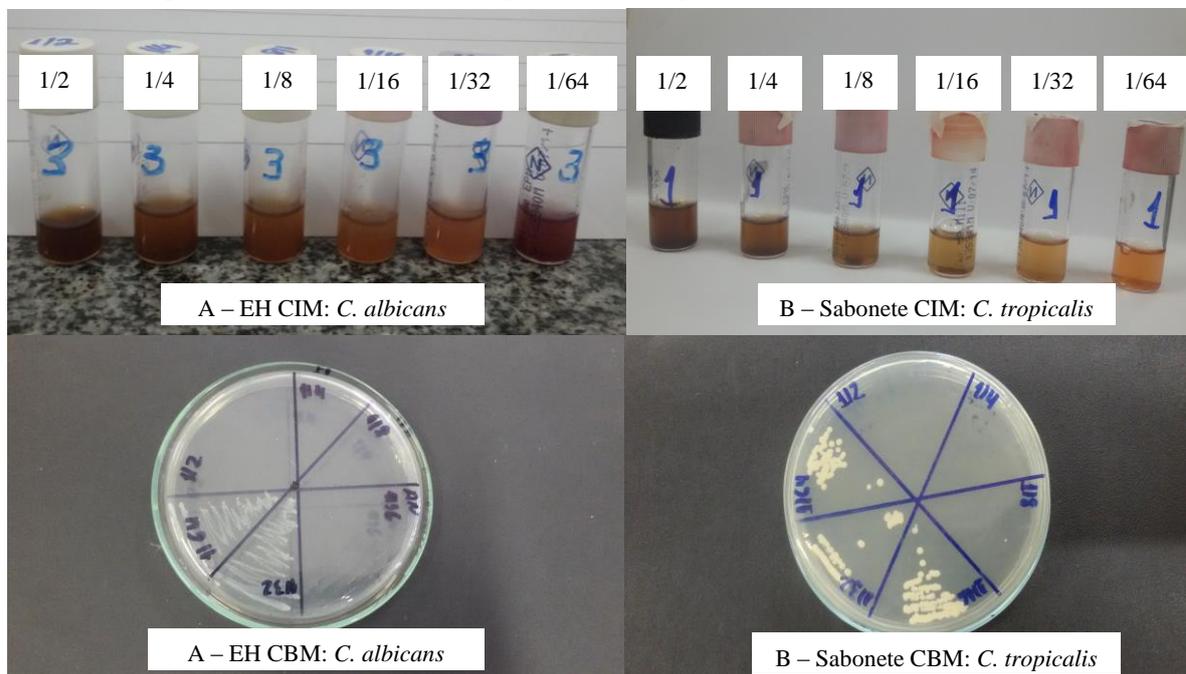
Tabela 12: Análise da Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do EH e das formulações sobre fungos de interesse clínico

Micro-organismos	Extrato ¹		Solução ²		Gel ³		Sabonete ⁴		CN ⁵
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	
<i>C. albicans</i>	0,3	0,6	-	-	0,008	0,008	0,017	0,017	0
<i>C. tropicalis</i>	1,2	2,4	-	-	0,008	0,017	0,002	0,008	0
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>C. glabrata</i>	0,6	1,2	-	-	0,004	0,008	0,008	0,017	0

¹CIM e CBM do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims (mg/mL); ²-ausência de atividade antimicrobiana; ³CIM e CBM do gel 5% (mg/mL); ⁴CIM e CBM do sabonete íntimo 5% (mg/mL); ⁵CN-controle negativo, álcool 70% - extrato, base do gel, base da solução e base do sabonete íntimo.

Fonte: elaborado pelo autor (2016)

Figura 13: Atividade antimicrobiana do EH e do sabonete íntimo das sementes de *Passiflora edulis* Sims pela técnica de macrodiluição sobre fungos de interesse clínico



Fonte: elaborado pelo autor (2016)

De todos os micro-organismos avaliados por diferentes métodos empregados para determinar a atividade antimicrobiana do EH e das formulações farmacêuticas das sementes de *Passiflora edulis* Sims, obteve-se melhor resposta para a atividade antifúngica, tanto pelo método de difusão em meio sólido quanto pela técnica de macrodiluição em caldo (Tabela 11

e Tabela 12). Fato que pode ser explicado pela afinidade de determinadas moléculas químicas presentes no EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims terem pela célula fúngica.

Proteínas extraídas das sementes do *Passiflora edulis* Sims reconhecidas como Pf1 e PF2 foram responsáveis por exibir atividades antifúngicas contra *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum musae*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Colletotrichum lindemuthianum* causando alterações significativas nas hifas capazes de modificar a morfologia da ATPase dos fungos, além de alterar a permeabilidade da membrana plasmática (AGIZZIO et al., 2003). Um estudo comparou as proteínas encontradas em diversas plantas com as proteínas presentes na semente de *Passiflora edulis* e demonstraram que diversas proteínas possuem efeitos antifúngicos, porém uma classe é citada em especial, os peptídeos de defesa e armazenamento 2S. Demonstrando a existência de um novo peptídeo 2S, o PE-AFP1, não alergênico e efetivo contra duas bactérias patogênicas, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. No entanto, não encontraram na proteína efeito inibitório contra *C. albicans* (PELEGRINI et al., 2006).

Portanto os estudos de Agizzio et al. (2003) e Pelegrini et al. (2006) indicam a possibilidade de as proteínas do maracujá serem efetivas apenas contra fungos filamentosos. Esse estudo demonstra maior atividade antifúngica do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims contra isolados clínicos do gênero *Candida*, o que indica possivelmente, que as substâncias responsáveis pelas atividades antimicrobianas podem estar presentes em outros constituintes da semente como por exemplo nos metabólitos secundários.

Avaliação antimicrobiana do gel contendo extrato das folhas de *Musa acuminata* em concentrações de 1% a 4% contra *E.coli* e *C. albicans* mostrou que a formulação apresentou melhor atividade contra *C. albicans* em todos os níveis de concentração com halo de 27 mm na concentração 4%. Os autores relatam que os compostos fenólicos presentes na espécie sejam supostamente os responsáveis pela ação antifúngica (BANKAR; DOLE, 2015). Essa pesquisa demonstra que o gel obtido do EH das sementes de *Passiflora edulis* Sims na concentração de 5% demonstrou melhor atividade antimicrobiana contra *C. glabrata* (Tabela 12) fato que possivelmente pode ser explicado pela forte presença de alguns compostos polifenólicos na espécie em estudo.

A ocorrência de leveduras do gênero *Candida* pode ser observada na microbiota residente humana. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* podem ser isoladas das superfícies sadias da cavidade bucal, vagina, trato gastrointestinal e região retal. No entanto, a condição debilitada do hospedeiro pode levar a processos infecciosos, sendo por esse motivo denominados de fungos oportunistas. Podem causar tromboflebite, endocardite, infecções oculares ou em qualquer órgão ou tecido quando introduzida por via intravenosa

(BASSETTI et al., 2006; CAPOOR et al., 2005; LAUPLAND, 2005). *C. albicans* é considerada a espécie do gênero *Candida* mais frequentemente isolada e a que apresenta maiores fatores de virulência (HARBARTH; SAMORE, 2005; ZÖLLNER; JORGE, 2003).

Diante do exposto, foi possível verificar o potencial antimicrobiano do extrato das sementes de *Passiflora edulis* Sims bem como de suas formulações farmacêuticas como proposta viável no desenvolvimento de novos produtos a serem utilizados no tratamento de doenças bacterianas e principalmente antifúngicas. Dentre as formulações farmacêuticas analisadas o gel e o sabonete íntimo obtiveram melhores respostas antimicrobianas para leveduras do gênero *Candida* de todos os micro-organismos analisados.

5 CONCLUSÃO

- a) A triagem fitoquímica do extrato das sementes de *Passiflora edulis* Sims revelou a presença em maior quantidade de compostos fenólicos com teor de polifenóis de $480,1 \pm 4,833$ (mgGA)/g e flavonoides $12,4 \pm 0,014$ (mgQE)/g do extrato seco.
- b) Os perfis de fragmentação do composto fenólico (CF) a partir das análises por LC-ESI-MSⁿ evidenciaram uma molécula inédita de Isoflavona.
- c) O extrato das sementes de *Passiflora edulis* Sims foi capaz de apresentar potencial antioxidante quinze vezes maior (0,0096 g/mL) na variável de concentração máxima e seis vezes maior na mínima titulação (0,0006 g/mL) do que o padrão de equivalente trolox (mg/g).
- d) O extrato apresentou maior potencial inibitório quando comparado com as formulações farmacêuticas sobre os micro-organismos avaliados, possuindo melhor atividade antimicrobiana contra os isolados clínicos de *E. faecalis*, *M. morganii* e *Candida albicans*. Das formulações farmacêuticas o gel apresentou melhor resposta contra o isolado clínico de *C. diphteriae* ATCC 27010 e *C. glabrata* e o sabonete íntimo apresentou melhor ação contra *C. tropicalis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, Bruno Vinicius de Barros et al. Quantificação de polifenóis de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith coletado no cerrado maranhense. **Revista de Ciências da Saúde**, São Luís, v. 8, n. 1, p.18-24, jun. 2006.
- AGIZZIO, Ana Paula et al. A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 416, n. 2, p.188-195, ago. 2003.
- AKANBI, Bolaji Oluwatosin; BODUNRIN, Opeyemi Dorcas; OLAYANJU, Segun. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Passiflora edulis*. **Researcher**, Abuja, v. 3, n. 5, p.9-12, maio 2011.
- AKHONDZADEH, S. et al. Passionflower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, Gisha Street, v. 26, n. 5, p.363-367, out. 2001.
- ARIF, Tasleem et al. Natural products – antifungal agents derived from plants. **Journal Of Asian Natural Products Research**, [s.l.], v. 11, n. 7, p.621-638, jul. 2009.
- ALVES, Ana Isabel Pereira. **Contributo para a caracterização química e atividade antioxidante de diferentes partes de *Passiflora edulis* Sims *edulis***. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Qualidade e Segurança Alimentar, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2013.
- ALVES, Clayton Queiróz et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p.2202-2210, out. 2010.
- ANTUNES, Rossana Pessoa et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 1, p.1-8, 2006.
- ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 2010. Brasília. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf. Acesso em: 12 ago. 2016.
- ARCHONDO, Marcia Del Llano. **Sistematização do desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo *Centella asiática* L. (Urban) / Systemization of the development of dermatological products containing Asian *Centella* L. (Urban) extract**. 2003. 210 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- ARRAIS, Luciana Gomes. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana e farmacológica de *Croton pulegioides* Baill. (EUPHORBIACEAE)**. 2012. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia Industrial, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

BADIEE, Parisa; ALBORZI, Abdolvahab. Susceptibility of clinical *Candida* species isolates to antifungal agents by E-test, Southern Iran: A five year study. **Iranian Journal Of Microbiology**, Iran, v. 3, n. 4, p.183-188, 2011.

BANKAR, Ajinkya M.; DOLE, Manjusha N. Formulation and evaluation of herbal antimicrobial gel containing *Musa acuminata* leaves extract. **Journal Of Pharmacognosy And Phytochemistry**, Kondhwa, p.1-3. nov. 2015.

BASSETTI, Matteo et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **Bmc Infectious Diseases**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-6, 10 fev. 2006.

BATISTA, Marisa Cristina Aranha et al. Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil. **Acta Amazonica**, São Luís, v. 46, n. 3, p.315-322, set. 2016.

BERNACCI, Luis Carlos et al. **Lista de espécies da flora do Brasil: Passifloraceae**. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=F B182>>. Acesso em: 11 ago. 2016.

BETONI, Joyce Elaine Cristina et al. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 4, p.1-4, 2006.

BOTT, R. F.; LABUZA, T. P.; OLIVEIRA, W. P. Stability Testing of Spray- and Spouted Bed-Dried Extracts of *Passiflora alata*. **Drying Technology**, [s.l.], v. 28, n. 11, p.1255-1265, 5 nov. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão**. Norma Aprovada – Oitava edição. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2016.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>>. Acesso em: 11 ago. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 971, 3 de maio de 2006**: Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. 2006. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt0971_03_05_2006.html>. Acesso em: 11 ago. 2016.

BRESOLIN, Tania Mari Belle; CECHINEL FILHO, Valdir. **Fármacos e Medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 2009. 436 p.

CAPOOR, Malini Rajinder et al. Emergence of non-albicans *Candida* species and antifungal resistance in a tertiary care hospital. **Japanese Journal Of Infectious Diseases**, New Delhi, v. 58, n. 6, p.344-348, 2005.

CARDOSO, Caroly Mendonça Zanella. **Manual de controle de qualidade de matérias-primas vegetais para farmácia magistral**. São Paulo: Pharmabooks, 2009. 148 p.

CUSHNIE, T.p. Tim; LAMB, Andrew J.. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.99-107, ago. 2011.

CDB. CONVENÇÃO DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA. **Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization to the Convention on Biological Diversity**. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, United Nations. 2011. Disponível em: <<http://www.cbd.int/abs/doc/protocol/nagoya-protocol-en.pdf>>. Acesso em: 11 ago. 2016.

CHAILLOU, Lucrecia Lucía; HERRERA, Humberto Antonio; MAIDANA, José Francisco. Estudio del propoleos de Santiago del Estero, Argentina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p.11-15, mar. 2004.

CNI. CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA (Brasil). **Estudos sobre os impactos da adoção e implementação do Protocolo de Nagoia para a indústria brasileira**. 2014. Disponível em: <http://arquivos.portaldaindustria.com.br/app/conteudo_24/2014/12/09/516/EstudosobreosImpactosdoProtocolodeNagoia.pdf>. Acesso em: 8 ago. 2016.

COWAN, Marjorie Murphy. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p.564-582, 1999.

DAGLIA, Maria. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.174-181, abr. 2012.

DEVAKI, K; SUNITHA, M. Antioxidant activity of *Passiflora edulis* Sims leaves. **Indian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 71, n. 3, p.310-315, 2009.

DHAWAN, Kamaldeep; DHAWAN, Sanju; SHARMA, Anupam. *Passiflora*: a review update. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 94, n. 1, p.1-23, set. 2004.

DI STASI, Luiz Claudio. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência**: Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Unesp, 1996. 230 p.

DINIZ, Ana Carolina Boeno; ASTARITA, Leandro Vieira; SANTARÉM, Eliane Romanato. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, p.443-450, 2007.

DUTRA, Maria da Glória. **Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás**. 2009. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente, Centro Universitário de Anápolis, Anápolis, 2009.

DZOTAM, Joachim K.; TOUANI, Francesco K.; KUETE, Victor. Antibacterial and antibiotic-modifying activities of three food plants (*Xanthosoma mafaffa* Lam., *Moringa oleifera* (L.) Schott and *Passiflora edulis* Sims) against multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-7, dez. 2015.

ECDC. EUROPEAN CENTER FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (Stockholm). **Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospital 2011-2012**. 2013. Disponível em: <<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2016.

FERRARI, Roseli Aparecida; COLUSSI, Francieli; AYUB, Ricardo Antonio. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá-aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p.101-102, 2004.

FERRO, Ana Flávia Portilho; BONACELLI, Maria Beatriz Machado; ASSAD, Ana Lúcia Delgado. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão e Produção**, Campinas, v. 13, n. 3, p.489-501, 2006.

FOGLIO, Mary Ann et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp**, Campinas, v. 7, n. 5, p.1-8, out. 2006.

FONSECA, Maira Christina Marques. **Epamig pesquisa, produção de plantas medicinais para aplicação no SUS**. 2012. Disponível em: <http://www.epamig.br/index.php?option=com_content&task=view&id=1430>. Acesso em: 13 ago. 2016.

FREITAS, Andréia de. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**. 2007. Disponível em: <<http://www.retisfito.org.br/eventos/ítem/135-estrutura-de-mercado-do-segmento-de-fitoterapicos-no-contexto-atual-da-industria-farmaceutica-brasileira>>. Acesso em: 13 ago. 2016.

GIBBONS, Simon. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, [s.l.], v. 21, n. 2, p.263-277, 2004.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C. M. O. et al. (orgs) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS, Editora da UFSC, 2004.

GUIDO, Rafael Victorio Carvalho; ANDRICOPULO, Adriano D.; OLIVA, Glaucius. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p.81-98, 2010.

HARBARTH, Stephan; SAMORE, Matthew. Antimicrobial resistance determinants and future control. **Emerging Infections Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 6, p. 794-801, 2005.

INFANTE, Juliana. **Composição fenólica e atividade antioxidante de polpa, casca, semente e folha de espécies frutíferas nativas do Brasil.** 2013. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

ISAAC, Vera Lúcia Barros. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 29, n. 1, p.81-96, 2009.

JOHNSON, Mark; MARIDASS, Muthia; IRUDAYARAJ, Santiago Stephen. Preliminary phytochemical and anti-bacterial studies on *Passiflora edulis*. **Ethnobotanical Leaflets**, India, v. 12, n. 1, p.425-432, 2008.

KANNAN, Sathiamoorthy; DEVI, B. Parimala; JAYAKAR, Latha. Antifungal activity of isolated compound from the leaves of *Passiflora edulis* Sims. **Current Pharma Research**, India, v. 1, n. 1, p.35-37, 2010.

KOBORI, Cíntia Nanci; JORGE, Neuza. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 5, p.1008-1014, 2005.

KRIEF, S. et al. Novel Antimalarial Compounds Isolated in a Survey of Self-Medicative Behavior of Wild Chimpanzees in Uganda. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, Bethesda, v. 48, n. 8, p.3196-3199, 23 jul. 2004.

LAUPLAND, K. B. Invasive *Candida* species infections: a 5 year population-based assessment. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 56, n. 3, p.532-537, 8 jul. 2005.

LEITAO, Suzana Guimaraes et al. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 1, p.6-11, 2006.

LEITE, João Paulo Viana. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas.** São Paulo: Atheneu, 2009. 328 p.

LÓPEZ, César A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, Roraima v. 1, n. 1, p. 19-27, 2006.

LUGATO, Danielle et al. Determination of antioxidant activity and phenolic content of extracts from in vivo plants and in vitro materials of *Passiflora alata* Curtis. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, [s.l.], v. 118, n. 2, p.339-346, 11 abr. 2014.

MARQUES, Isabela Cristina de Souza. **Pomada a base de óleo de semente de maracujá no tratamento de lesões cutâneas em coelhos.** 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Cirurgia Veterinária, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2012.

MARTINS, Ernane Ronie et al. **Plantas medicinais.** Viçosa: Editora UFV, 2003. 220 p.

MATOS, Francisco José de Abreu. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: UFC, 2009. 25 p.

MEDEIROS, Ana Claudia Dantas de. Análise de contaminantes microbiológicos em produtos comercializados em farmácia de manipulação. **Revista de Biologia e Farmácia**, Paraíba, v. 1, n. 1, p.1-12, 2010.

MENDEZ, Andreas Sebastian Loureiro et al. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 32, n. 1, p.105-111, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS: RENISUS**. 2009. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf>. Acesso em: 20 set. 2016.

MODOGGIO, Fernanda Angélica. **Investigação fitoquímica das partes aéreas de *Passiflora alata* Curtis**. 2011. 219 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

MOHANASUNDARI, Chokkalingam et al. Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L.–a common exotic medicinal plant. **African Journal of Biotechnology**, Africa, v. 6, n. 23, 2007.

MONTELLI, Augusto Cezar; SADATSUNE, Terue. Antibioticoterapia para o clínico. **Sociedade Brasileiro de Microbiologia**, São Paulo, v. 5, n. 2, p.1-3, 2001.

NEWMAN, David. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 51, n. 9, p. 2589-2599, 2008.

NICHOLLS, Joan Middle; BIRNER J. Passicol, an antibacterial and antifungal agent produced by *Passiflora* plant species: qualitative and quantitative range of activity. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, Washington, v. 3, n. 1, p.110-117, 1973.

NIPPON, M. K. K. Angiotensin converting enzyme and aldosereductase inhibitory agent-comprises *Passiflora quadrangularis* extract with organic solvent or water, or vitexin. **Patent No.** [s.l.], v. 2, p.1995-1997, 1993.

NKHATA, Bimo Abraham et al. A typology of benefit sharing arrangements for the governance of social-ecological systems in developing countries. **Ecology And Society**, Atlanta, v. 17, n. 1, p.1-17, 2012.

NUNES, Emmanuel Borges et al. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, Pará, v. 2, n. 4, p.23-30, dez. 2011.

OLIVEIRA, Rinalda Guerra de et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 1, p.1-6, 2006.

OSMA, Johanny Aguillón et al. Antioxidant and antiproliferative activity of ethanolic and aqueous extracts from leaves and fruits juice *Passiflora edulis*. **Perspectivas En Nutrición Humana**, Medellín, v. 15, n. 1, p.13-25, jun. 2013.

OSTROSKY, Elissa A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 2, p.301-307, jun. 2008.

PATERSON, Ian; ANDERSON, Edward. **The Renaissance of Natural Products as Drug Candidates**. Science, [s.l.], v. 310, n. 21, p. 451-453, out. 2005.

PELEGRINI, P.b. et al. An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Proteins And Proteomics**, [s.l.], v. 1764, n. 6, p.1141-1146, jun. 2006.

PEREIRA, Cíntia A. M. et al. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.241-248, jul. 2004.

PETRY, Raquel D. et al. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.162-164, 2001.

PHILLIPS, I et al. A guide to sensitivity testing. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.27, p.1-47, 1991.

PIDDOCK, Laura J. V. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. **Journal Of Applied Bacteriology**, [s.l.], v. 68, n. 4, p.307-318, abr. 1990.

PIMENTEL, Vitor Paiva et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 43, p.1-49, 2015.

PINELLI, L. L. O et al. Antioxidantes e propriedades sensoriais das infusões de passiflora selvagens do cerrado brasileiro: potencial como bebidas funcionais. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 1500-1506, 2015.

PINTO, Marco Aurélio Sampaio. **Técnicas de separação e identificação aplicadas a produtos naturais**. 2005. 52 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli; KANERO, Telma Mary; PINTO, Antonio Felizes. **Controle biológico da qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 4. ed. São Paulo: Manole, 2015. 432 p.

RECH, Aline Pereira de Arruda et al. Biotecnologia e diversidade biológica: desafio para educação na sociedade em rede. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 19, n. 2, p.1545-1554, 2015.

REIMBERG, Maria Célia Hibari. **Estudo de algumas variáveis que interferem na concentração de flavonóides do cultivo de folhas de Passiflora incarnata L.** 2006. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006

RICE-EVANS, Catherine A.; MILLER, Nicholas J.; PAGANGA, George. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 20, n. 7, p.933-956, jan. 1996.

RIPA, Farhana Alam et al. Antibacterial, cytotoxic and antioxidant activity of *Passiflora edulis* Sims. **European Journal Of Scientific Research**, Seychelles, v. 31, n. 4, p.592-598, 2009.

ROCHA, Cláudia Quintino da et al. Isolation, identification, quantification and antioxidant activity of secondary metabolites from coastal Brazilian herbs. **Planta Medica**, New York, v. 80, n. 16, p.0-1, 30 out. 2014.

ROCHA, F. A. G. et al. O uso terapêutico da flora na história mundial. **Holos**, Rio Grande do Norte. v. 1, n. 0, p. 49, 2015.

RODRIGO, Márcia Gonçalves. **A pesquisa para a conservação da biodiversidade no brasil: a ecologia a partir de um enfoque interdisciplinar.** 2009. 284 f. Tese (Doutorado) - Curso de Política Científica e Tecnológica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

ROSA, Aline Marques et al. Análise microbiológica de xampus e cremes condicionadores para uso infantil. **Journal Of Basic And Applied Pharmaceutical Sciencies**, Araraquara, v. 36, n. 1, p.1-8, 2015.

RUDNICKI, Martina et al. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 100, n. 2, p.719-724, jan. 2007.

SACCARO JUNIOR, Nilo Luiz. A regulação do acesso a recursos genéticos no Brasil: sugestões para um novo cenário. **Sustentabilidade em Debate**, Brasília, v. 4, n. 2, p.194-214, 2013.

SANTOS, José Joacir dos. **Fitoterapia: Dos senhores e das ervas medicinais.** 2006. Disponível em: <<http://www.joacir.com.br/fitoterapia-dos-senhores-as-ervas-medicinais/>>. Acesso em: 13 ago. 2016.

SALAS, Maria Paula et al. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 124, n. 4, p.1411-1415, fev. 2011.

SEIDEMANN, Stahl, E.: *Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook*, 2nd. Edit., fully revised and expanded, with Contribution by 25 authors. Translated from the German by M. R. F. Ashword. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1969. Distribution rights for U. K. and Commonwealth (excluding Canada). **Starch - Stärke**, [s.l.], v. 22, n. 11, p.410-411, 1970.

SERPA, R. et al. In vitro antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. **Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 61, n. 12, p.1704-1708, 23 ago. 2012.

SHAHIDI, Fereidoon; HO, Chi-tang. Phenolic Compounds in Foods and Natural Health Products. **Acs Symposium Series**, [s.l.], p.315-320, 21 jul. 2005.

SHAHIDI, Fereidoon; NACZK, Marian. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Boca Raton: Crc Press, 2003. 531 p.

SIEBRA, Ana Luiza A. et al. Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [s.l.], p.1-7, jan. 2016.

SILVA, Jaqueline Gomes da et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, n. 4, p.1-6, 2007.

SILVA, Lidiane Aparecida Guimarães da et al. Controle de qualidade microbiológico de formulação magistral contendo fitoterápico. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, Goiás, v. 7, n. 2, p.1-8, 2014.

SILVA, Luciano da Rocha et al. **Levantamento Etnobotânico das Plantas Medicinais utilizadas pela população de Iporá**. III Seminário de Iniciação Científica - UEG, Iporá, 2006.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: UFRGS, 2004. 1104 p.

SIMÕES, Claudia Maria Oliveira. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis: UFRGS, 2000. 821 p.

SOUSA, Cleyton Marcos de Melo et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p.351-355, 2007.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Plant physiology**. 4. ed. Surderkand Massachusetts: Sinauer, 2006. 559 p.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 720 p.

ULMER, Torsten; MACDOUGAL, John. **Passiflora: passionflowers of the world**. Portland: Amazon, 2004. 432 p.

UNU-IAS. United Nations University - Institute of Advanced Studies: **Report. Bioprospecting of Genetic Resources in the Deep Seabed: Scientific, Legal and Policy Aspects**. 2005. Disponível em: <<https://www.cbd.int/financial/bensharing/g-absseabed.pdf>>. Acesso em: 14 ago. 2016.

VIZZOTTO, Márcia; KROLOW, Ana Cristina; WEBER, Gisele Eva Bruch. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. 2010. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/886074/1/documento316.pdf>> . Acesso em: 14 ago. 2016.

WALKER, T. D. The Medicines Trade in the Portuguese Atlantic World: Acquisition and Dissemination of Healing Knowledge from Brazil (c. 1580-1800). **Social History Of Medicine**, Oxford, v. 26, n. 3, p.403-431, 16 maio 2013.

WOISKY, Ricardo G; SALATINO, Antonio. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Of Apicultural Research**, [s.l.], v. 37, n. 2, p.99-105, jan. 1998.

YAMAMOTO, Célia Hitomi et al. **Controle de Qualidade Microbiológico de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos e Fitoterápicos Produzidos na Zona da Mata, MG**. 2004. Disponível em: <<https://www.ufmg.br/congrext/Desen/Desen7.pdf>>. Acesso em: 14 ago. 2016.

YULDASHEVA, L.N. et al. Cholesterol-dependent hemolytic activity of *Passiflora quadrangularis* leaves. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p.1-10, jul. 2005.

ZÖLLNER, Maria Stella Amorim da Costa; JORGE, Antonio Olavo Cardoso. *Candida* spp. occurrence in oral cavities of breastfeeding infants and in their mothers' mouths and breasts. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 2, p.1-5, jun. 2003.

