

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

Gabriel Davi Marena

Avaliação do potencial antimicrobiano e toxicogenético de extratos de *Bauhinia holophylla* e *Myrcia bella* incorporados ou não em microemulsões

Araraquara, SP
2018

Gabriel Davi Marena

Avaliação do potencial antimicrobiano e toxicogénico de extratos de *Bauhinia holophylla* e *Myrcia bella* incorporados ou não em microemulsões

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Flávia Aparecida Resende Nogueira
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a. Tais Maria Bauab

Araraquara, SP
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

M279a Marena, Gabriel Davi

Avaliação do potencial antimicrobiano de extratos de *Bauhinia hollophylla* e *Myrcia bella* incorporados ou não em microemulsões
Gabriel Davi Marena. –Araraquara: Universidade de Araraquara, 2018.
109p.

Dissertação (Mestrado)- Curso de Biotecnologia em Medicina
Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara

Orientador: Profa. Dra Flávia Aparecida Resende Nogueira
Coorientador: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

1. Nanotecnologia. 2. Microemulsões. 3. Mutagenicidade.
4. Citotoxicidade. 5. Antimicrobianos. 6. Produtos naturais. I. Título.

CDU 577.1:66



GABRIEL DAVI MARENA

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 29 de novembro de 2018.

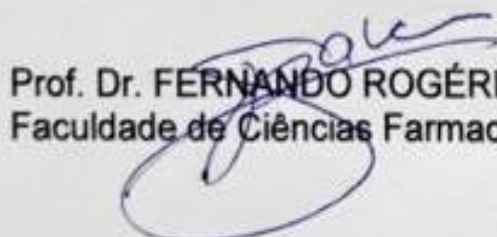
BANCA EXAMINADORA



Prof^ª Dr^ª FLÁVIA APARECIDA RESENDE NOGUEIRA (Orientadora)
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. MARLUS CHORILLI
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP



Prof. Dr. FERNANDO ROGÉRIO PAVAN
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

Apresentação

Eu apresento a vida, um palco onde as pessoas devem aproveitar cada milésimo de segundo. Aproveite os aplausos, os sorrisos, a melodia, a alegria e a fantasia, antes que o show acabe e as cortines se fechem para sempre. (Gabriel Marena)

Este trabalho foi desenvolvido em cooperação com o Laboratório de Micobacteriologia em colaboração com o aluno de doutorado Rone Aparecido De Grandis, sob supervisão do Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan, Laboratório de Farmacotécnica em colaboração com a aluna de pós-doutorado Patrícia Bento da Silva, sob supervisão do Prof. Dr. Marlus Chorilli e Laboratório de Fisiologia de Microrganismos em colaboração com o aluno de doutorado Matheus Aparecido dos Santos Ramos, sob supervisão da Prof. Dr^a. Tais Maria Bauab (Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP) junto com o Laboratório de Mutagênese da Universidade de Araraquara – UNIARA.

Agradecimentos

A água irriga e deixa a terra mais suave. A terra faz com que a vida seja possível. O ar permite a sobrevivência dos seres. O vento traz a refrescância da vida. O sol faz da escuridão uma simples vítima. A lua nos acolhe em noites frias com a sua luz. Enfim, sou uma árvore que gera frutos graças a todos que de alguma forma contribuíram em minha vida, pois, quando semente, para germinar e ver a luz do sol, todos estenderam a mão. (Gabriel Marena)

Primeiramente, quero agradecer ao meu melhor amigo, meu pai, que sempre esteve ao meu lado dando forças para continuar a batalha. Mesmo nas derrotas, sempre com seu ombro amigo e colo de pai. Hoje, devo agradecer a Deus por ter me dado de presente um exemplo de vida. Obrigado meu PAI, por sempre acreditar em seu filho e que, mesmo grande, sempre cuidou como se fosse aquele menino inocente em seu colo;

A pessoa mais importante da minha vida. Mãe, que fez o possível e o impossível para ver o seu filho formado. Sempre com seu colo de mãe nas horas difíceis. Presente em todos os momentos na minha vida e fez dos momentos mais amargos da vida, um simples gesto de mãe, amar. Há tantas estrelas no céu e Deus me presenteou com uma estrela aqui na terra e graças ao seu brilho refulgente, iluminou o meu caminho para nunca se perder e chegar até a glória;

A minha orientadora Prof^ª Flávia, que sempre me incentivou. Uma segunda mãe que encontrei no âmbito científico e que soube me acolher nos momentos alegres e difíceis dessa caminhada. Puxão de orelha quando necessário, mas sempre com apoio e carinho com seus alunos. Mesmo em meio a tantas dificuldades, conseguimos grandes triunfos. Que o Espírito Santo continue a te guardar, confortar e defender aqui na terra, pois lá no céu já existe anjos supervisionando. Obrigado por tudo, e que nossa jornada não acabe por aqui;

A minha co-orientadora Prof^ª Tais, que me acolheu em seu laboratório como um filho. Seu amor é imenso, assim como o seu coração também se engrandece por tamanha generosidade e amor. Que o Espírito Santo te conforte, ilumine e fortaleça a sua alma que já é bela. Confesso que nos primeiros momentos tive medo, mas logo senti que aquele lugar não era apenas um laboratório, e sim, um lar de grandes amigos e de grandes histórias;

A minha amiga Patrícia Bento e seus alunos de Iniciação Científica, Andressa e Ana, pela enorme dedicação e atenção. Patrícia, muito obrigado por contribuir com seu impressionante conhecimento científico. Doeu o seu puxão de orelha, mas foi muito importante no meu crescimento pessoal e científico;

Ao meu amigo Rone De Grandis que me acompanhou atenciosamente nos testes de citotoxicidade. Sou muito grato pela grande ajuda e colaboração. Um grande profissional que soube compartilhar seus conhecimentos, que não são poucos, e contribuir no sucesso deste trabalho;

Ao meu amigo Matheus Ramos que me acompanhou nos testes antimicrobianos. Uma pessoa que transborda alegria em sua face. Um gigante que se fez pequeno para transformar pequenos em gigantes;

Ao meu amigo Anderson “Derson” que sempre estava ao meu lado na tomada de decisões e, principalmente, tornar os momentos mais alegres. Sempre dando dicas importantes que contribuíram no enriquecimento deste trabalho;

A minha amiga Bruna Bonifácio que me ajudou com seus grandes conselhos e exemplos de vida. Uma pessoa que representa a sinceridade, alegria e humanismo. Como diz a música, “Algo bom vai acontecer, algo bom Deus tem para você” hoje e sempre. Uma rosa do prado e gigantesco é ficar ao seu lado;

A minha amiga Giovana Fortunato que inundou meu coração com a sua alegria e esperança. Sempre ao meu lado ajudando erguer a espada e seguir lutando. Posso considera-la como uma mãe, pois sempre estava me defendendo em todos os obstáculos que surgia. Como escudo, me defendestes de tudo e de todos;

A minha amiga Bruna Furquim que foi como um anjo em minha vida com seus conselhos que me ajudaram a tomar decisões importantes. Uma irmã que ganhei no âmbito científico, demonstrando preocupação e vontade de ajudar em tudo que era preciso. Que formidável é tê-la como amiga de alma e coração;

A minha amiga Nathália Fregonezzi que compartilhou seu grande conhecimento no início de minha carreira científica e que levarei comigo pro resto da vida. Uma pessoa que transborda simpatia e que transforma o ambiente no mais agradável possível;

As secretárias Sandra e Margarete que me ajudaram em tudo que era preciso e que foram fundamentais durante a execução deste trabalho;

Aos Profs Drs Fernando Pavan e Marlus Chorilli pela permissão de entrar em seus laboratórios para realizar parte dos testes. Os meus sinceros agradecimentos;

Gostaria de agradecer imensamente o grupo de Mutagênese da UNIARA; Rafaela e Nádia que dedicaram incansavelmente todo o tempo, atenção e opiniões que serviram para engrandecer este trabalho. Também gostaria de agradecer as alunas Vanessa, Jaqueline, Maria Júlia, Beatriz, Luiza, Amanda e Mariana pelo esforço e dedicação em dias que eram realizados os testes deste trabalho;

A UNIARA, onde dediquei o máximo possível por 6 anos de minha vida;

Ao grupo QUIMMERA pela oportunidade de concretizar este trabalho;

Aos Profs da PPGB-MRQM que compartilharam seus conhecimentos, ensinando e aprendendo ao mesmo tempo com muito amor e carinho;

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior) pela concessão da bolsa de estudo;

Agradeço a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho;

Enfim, quero agradecer a Deus por estes momentos incríveis que vivi e que ainda estão por vir. Ao seu filho Jesus Cristo, que por mim e por todos, uma cruz lhe restou e nos salvou, seu sangue que escorreu e seu corpo ressuscitado fez de nós, pecadores, merecedores do seu perdão. A Virgem Maria de Nazaré, mãe de Deus e nossa mãe, Imaculada Conceição. Maria que carregou Cristo quando pequeno e 33 anos depois o carregou com tanta dor. Mãe esta que nos acolhe em seu manto sagrado, nos conforta, nas dores, nos aquece em noites frias e nos ama acima de todas as coisas;

Minha protetora, Santa Luzia, portadora da luz e guia da paz. De jornadas escuras uma luz surgiu para iluminar as estradas da vida;

A Deus, Jesus Cristo e Maria Imaculada Conceição, eu vos digo: “que se prenda a minha língua ao céu da boca e que minha mão seca, se de ti Jerusalém eu me esquecer”
(Salmo 136).

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS	16
LISTA DE ABREVIATURAS	17
1. Introdução	20
1.1. Produtos naturais.....	20
1.2. Importância da busca de novos antimicrobianos.....	26
1.3. Nanotecnologia.....	29
2. Objetivos	32
2.1. Objetivo geral.....	32
2.2. Objetivos específicos.....	32
3. Material e Métodos	34
3.1. Obtenção e procedência das amostras vegetais.....	34
3.1.1. <i>B. holophylla</i> (Bong.) Steud (Fabaceae)	34
3.1.2. <i>M. bella</i> Cambess. (Myrtaceae)	34
3.2. Preparação dos extratos EtOH 70%	34
3.3. Desenvolvimento dos sistemas lipídicos nanoestruturados	35
3.4. Caracterização do sistema lipídico nanoestruturado	37
3.4.1. <i>Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)</i>	37
3.4.2. <i>Espectroscopia de absorção no Infravermelho (FTIR)</i>	38
3.5. Preparo das amostras para a realização dos ensaios biológicos.....	38
3.6. Meios de cultura e soluções.....	39
3.7. Atividade antimicrobiana	39
3.7.1. <i>Amostras microbiológicas</i>	40
3.7.2. <i>Estocagem e manutenção das amostras microbiológicas</i>	40
3.7.3. <i>Padronização das suspensões microbiológicas</i>	41
3.7.4. <i>Controles</i>	41
3.7.5. <i>Atividade antibacteriana - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</i>	42
3.7.6. <i>Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)</i>	43

3.7.7. <i>Atividade antifúngica - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</i>	43
3.7.8. <i>Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)</i>	43
3.8. Citotoxicidade em linhagens celulares.....	44
3.9. Mutagenicidade (Teste de Ames).....	47
3.10. Ensaio de liberação in vitro.....	50
4. Resultados	53
4.1. Sistemas lipídicos nanoestruturados.....	53
4.2. Caracterização dos sistemas lipídicos nanoestruturados.....	54
4.3. Espectroscopia de absorção no Infravermelho (FTIR).....	57
4.4. Atividade antimicrobiana.....	60
4.5. Citotoxicidade.....	64
4.6. Mutagenicidade	71
4.7. Ensaio de liberação	74
5. Discussão	77
6. Conclusões	86
7. Referências bibliográficas	89
Anexos	103

RESUMO

MARENA, Gabriel Davi. **Avaliação do potencial antimicrobiano e toxicogenético de extratos de *Bauhinia holophylla* e *Myrcia bella* incorporados ou não em microemulsões.** 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal) Universidade de Araraquara.

As plantas têm sido uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos com diversos modelos para a síntese de muitos fármacos. *Myrcia bella* conhecida popularmente de “Pedra hume caá” e *Bauhinia holophylla* como “Pata de vaca” são plantas medicinais, cuja utilização é capaz de beneficiar algumas necessidades da população como contra a diabetes, hemorragias, hipertensão, úlceras, problemas gástricos, entre outros. No entanto, muitos desses benefícios ainda não foram comprovados cientificamente e de acordo com estudos prévios realizados pelo nosso grupo, os extratos etanólicos 70% (EtOH 70%) dessas espécies vegetais apresentam grande potencial mutagênico pelo teste de Ames (dados não publicados). Neste contexto, uma alternativa para o aprimoramento de diversos parâmetros, como biodisponibilidade e toxicidade é a incorporação destes em sistemas nanotecnológicos de liberação de fármacos para que o produto ativo tenha uma melhor ação. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito toxicogenético e a atividade antimicrobiana de extratos EtOH70% de folhas de *M. bella* e *B. holophylla* incorporados e não incorporados em sistemas lipídicos nanoestruturados (SLNs). Os extratos foram incorporados em duas formulações; ambas possuem como tensoativo, uma mistura de polioxietileno 20 cetil éter (Brij[®] 58) e fosfatidilcolina de soja na proporção 2:1 e como fase aquosa *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pH 7,4. O que difere é que uma possui o óleo de semente de uva (OSU) e colesterol na proporção de 5:1 como fase oleosa (SLN1) e a outra somente o colesterol (SLN2). O potencial antimicrobiano foi avaliado contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e as leveduras *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* pela a técnica de diluição em microplacas, a citotoxicidade frente as células GM-07492 que são fibroblastos normais, HeLa células de adenocarcinoma cervical humano e HepG2 células de carcinoma hepatocelular humano, e a mutagenicidade pelo teste de Ames. Os resultados obtidos mostraram que os extratos não incorporados foram mais eficazes que os incorporados, tanto para os fungos quanto para as bactérias avaliadas. Além disso, os extratos incorporados induziram uma citotoxicidade maior do que os não incorporados frente as linhagens testadas. Com relação a mutagenicidade, a incorporação dos extratos nos SLNs inibiu em parte o potencial mutagênico previamente observado pelos extratos livres. Em conclusão, o presente estudo fornece suporte às propriedades antimicrobianas dos extratos de *M. bella* e *B. holophylla*, livres e associados a nanotecnologia, contribuindo na busca de novos produtos naturais com atividades biológicas. No entanto, a investigação dos mecanismos de ação é a chave para o desenvolvimento farmacológico, além disso, considerando os efeitos toxicogenéticos, essas plantas devem ser usadas com cautela para fins medicinais.

Palavras-chave: Nanotecnologia; microemulsões; mutagenicidade; citotoxicidade; antimicrobianos; produtos naturais.

ABSTRAT

MARENA, Gabriel Davi. **Evaluation of the antimicrobial and toxicogenic potential of extracts of *Bauhinia holophylla* and *Myrcia bella* incorporated or not in microemulsion.** 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal) Universidade de Araraquara.

Plants have been an important source of biologically active natural products with various models for the synthesis of many drugs. *Myrcia bella* popularly known as "Pedra hume caá" and *Bauhinia holophylla* as "Pata de vaca" are medicinal plants, whose use is capable of benefiting some needs of the population as against diabetes, hemorrhages, hypertension, ulcers, gastric problems, among others. However, many of these benefits have not yet been scientifically proven and according to previous studies carried out by our group, ethanolic 70% extracts (EtOH 70%) of these plant species have great mutagenic potential by the Ames test (unpublished data). In this context, an alternative for the improvement of several parameters, such as bioavailability and toxicity is the incorporation of these in nanotechnology systems of drug release so that the active product has a better action. Thus, the objective of the present study was to evaluate the toxicogenic effect and antimicrobial activity of EtOH70% extracts of leaves of *M. bella* and *B. holophylla* incorporated and not incorporated in nanostructured lipid systems (NLSs). The extracts were incorporated into two formulations; both have as surfactant, a mixture of polyoxyethylene 20 cetyl ether (Brij® 58) and soybean phosphatidylcholine 2: 1 and as the aqueous phase Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4. What differs is that one has grape seed oil (GSO) and cholesterol 5: 1 as oil phase (NLS1) and the other only the cholesterol (NLS2). The antimicrobial potential was evaluated against the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and yeasts *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* by the microplate dilution technique, the cytotoxicity against GM- 07492 cells which are normal fibroblasts, HeLa human cervical adenocarcinoma cells and HepG2 human hepatocellular carcinoma cells, and the mutagenicity by the Ames test. The results showed that the unincorporated extracts were more effective than those incorporated for fungi and bacteria. Also, the incorporated extracts induced greater cytotoxicity than those not incorporated in the tested strains. Regarding mutagenicity, the incorporation of the extracts in NLSs partially inhibited the mutagenic potential previously observed by the free extracts. In conclusion, the present study supported the antimicrobial properties of extracts of *M. bella* and *B. holophylla*, free and associated to nanotechnology, contributing in the search for new natural products with biological activities. However, investigating the mechanisms of action is the key to pharmacological development, also, considering toxicogenic effects, such plants should be used with caution for medicinal purposes.

Keywords: Nanotechnology; microemulsions; mutagenicity; cytotoxicity; antimicrobials; natural products.

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1 - Folhas e frutos de <i>Myrcia bella</i>	24
Figura 2 - Folhas bilobuladas de <i>Bauhinia</i> sp.....	25
Figura 3 -Aspectos dos Sistemas Lipídicos Nanoestruturados SLN1 (A) e SLN2 (B)..	36
Figura 4 - Diagrama de fases.....	36
Figura 5 - Célula eletroforética.....	38
Figura 6 - Esquema de organização do teste antimicrobiano em microplaca.....	40
Figura 7 - Fotomicrografias das linhagens celulares GM-07492 (A), HepG2 (B) e HeLa (C).....	45
Figura 8 - Esquema de organização do teste de citotoxicidade em microplaca.....	47
Figura 9 – Esquema do Teste de Ames.....	49
Figura 10 - Aparato para a análise da liberação in vitro das amostras-teste.....	51
Figura 11 - Classificação do diagrama de fases.....	53
Figura 12 – Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersidade (IPD) e potencial Zeta (PZ) das bases SLN1 (A) e SLN2 (B), bem como dos extratos incorporados.....	56
Figura 13 – Espectros do óleo de semente de uva (OSU), tensoativo e base SLN1 obtidos pela técnica FTIR.....	58
Figura 14 – Espectros dos extratos incorporados e não incorporados de <i>M. bella</i> e <i>B. holophylla</i> , bem como das bases SLN1 e SLN2 obtidos pela técnica FTIR.....	59
Figura 15 - Ensaio de viabilidade celular com as linhagens GM-07492 (A), HepG2 (B), HeLa (C) tratadas com os extratos de <i>M. bella</i> e <i>B. holophylla</i>	65
Figura 16 - Ensaio de viabilidade celular com as linhagens GM-07492 (A), HepG2 (B) e HeLa (C) tratadas com os extratos incorporados de <i>M. bella</i> e <i>B. holophylla</i> nos sistemas lipídicos nanoestruturados contendo (SLN1) ou não (SLN2) óleo de semente de uva.....	67
Figura 17 - Ensaio de viabilidade celular com as linhagens GM-07492 (A), HepG2 (B) e HeLa (C) tratadas com as bases dos sistemas lipídicos nanoestruturados contendo (SLN1) ou não (SLN2) óleo de semente de uva, além do óleo de semente de uva e tensoativo isoladamente.....	69
Figura 18 - Curva padrão obtida no ensaio de liberação in vitro dos extratos de <i>M.</i>	

bella e *B. holophylla*..... 74

Figura 19 - Ensaio de liberação in vitro dos extratos livres e incorporados de *M.*

bella (A) e *B. holophylla* (B) nos sistemas lipídicos nanoestruturados contendo (SLN1) ou não (SLN2) óleo de semente de uva..... 75

LISTA DE TABELAS

	Pag.
<p>Tabela 1. Médias e desvios-padrão do diâmetro hidrodinâmico, do índice de polidispersidade (IPD) e potencial Zeta (PZ) para as bases com (SLN1) e sem (SLN2) o óleo de semente de uva, bem como dos extratos incorporados.....</p>	55
<p>Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos incorporados e não incorporados de <i>M. bella</i> e <i>B. holophylla</i> frente as bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>.....</p>	61
<p>Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos incorporados e não incorporados de <i>M. bella</i> e <i>B. holophylla</i> frente a diferentes espécies de <i>Candida</i>.....</p>	63
<p>Tabela 4 - EC₅₀ dos extratos incorporados de <i>M. bella</i> e <i>B. holophylla</i> nos sistemas lipídicos nanoestruturados contendo (SLN1) ou não (SLN2) óleo de semente de uva.....</p>	70
<p>Tabela 5 - Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100 e TA102 de <i>S. typhimurium</i> após o tratamento com o extrato incorporado de <i>M. bella</i>, bem como das bases SLN1 e SLN2, OSU e tensoativo (T).....</p>	72
<p>Tabela 6 - Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100 e TA102 de <i>S. typhimurium</i> após o tratamento com o extrato incorporado de <i>B. holophylla</i>, bem como das bases SLN1 e SLN2, OSU e tensoativo (T).....</p>	73

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS - Organização Mundial da Saúde
ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
GSH-Px - Glutathione Peroxidase
GR - Glutathione Redutase
GSH – Glutathione
ALT - Alanina Aminotransferase
AST - Aspartato Aminotransferase
CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos
EARSS - *European Antimicrobial Resistance Surveillance System*
GGTES - Gerência de Tecnologia em Serviços de Saúde
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
OSU - Óleo de Semente de Uva
PBS - *Phosphate Buffered Saline*
Brij[®] 58 - Polioxietileno 20 cetil éter
DLS - Dispersão de Luz Dinâmica
IPD – Índice de Polidispersão
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*
DMSO - Dimetilsulfóxido
NaCl - Cloreto de Sódio
KCL – Cloreto de Potássio
Na₂HPO₄ - Fosfato de Sódio Dibásico Anidro
KH₂PO₄ - Fosfato Potássio Monobásico Anidro
CP – Controle Positivo
CN – Controle negativo
CMH - Caldo Mueller Hilton
CIM - Concentração Inibitória Mínima
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CSD - Caldo Sabouraud Dextrose
CBM - Concentração Bactericida Mínima
AHM - Agar Mueller Hilton
TTC - Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio

CFM - Concentração Fungicida Mínima

ASD - Ágar Sabouraud Dextrose

DMEM - *Dulbecco's modification of Eagle's medium*

SLN – Sistema Lipídico nanoestruturado

SBF - Soro Bovino Fetal

SLT - Sistema Líquido Translúcido

SVT - Sistema Viscoso Translúcido

SLO - Sistema Líquido Opaco

SVO - Sistema Viscoso Opaco

SVST - Sistema Viscoso Semi Translúcido

SF - Separação de Fases

Introdução

A única inveja idolatrável nesta vida é pelo brilho das estrelas. Quero ser refulgente como as estrelas. Não quero obstaculizar o caminho das pessoas pelo irradiante brilho, mas sim, servir de exemplo para gerações futuras. (Gabriel Marena)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos naturais

A utilização de plantas para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA JUNIOR e PINTO, 2005). Há relatos, por exemplo, do uso de plantas com finalidades terapêuticas por volta de 3.000 a.C. na obra “*Pen Ts’ao*” do chinês Shen Nung (KO, 1999; TYLER, 1996). Outros registros foram encontrados no manuscrito Egípcio “*Ebers Papyrus*”, de 1.500 a.C., em que continham informações sobre 811 prescrições e 700 drogas (FIRMO et al., 2011). No ano 78 d.C., o botânico grego Pedânios Dioscórides descreveu cerca de 600 plantas medicinais, além de produtos minerais e animais no tratado “*De Materia Medica*”, que permaneceu como fonte de referência por mais de quatorze séculos (ROBBERS et al., 1996; TYLER, 1996). Dessa maneira, foi e é baseado em um conhecimento empírico adquirido por séculos em diferentes grupos étnicos que as propriedades terapêuticas de determinadas plantas vão sendo descobertas e propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006; ESPANHA et al., 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 60-80% da população mundial nos países em desenvolvimento, devido à pobreza e falta de acesso à medicina tradicional, dependem essencialmente de plantas para cuidar da saúde. Além disso, hoje de uma maneira ainda mais evidente, diversas plantas são comercializadas apoiadas em propagandas que prometem "benefícios seguros, já que se trata de fonte natural" (VEIGA JUNIOR e PINTO, 2005). Essa prática se deve à crescente perda de credibilidade na medicina comum, à falta de acesso aos medicamentos sintéticos e à baixa disponibilidade de medicamentos distribuídos pela rede pública de atendimento (PORTAL DA SAÚDE, 2009).

Além do uso popular, as plantas medicinais desempenham um papel muito importante na medicina moderna (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006), contribuindo fortemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas por meio de seus metabólitos secundários (FIRMO et al., 2011). Elas podem fornecer fármacos extremamente importantes, os quais dificilmente seriam obtidos via síntese química, fornecendo compostos que podem ser levemente modificados, tornando-os mais eficazes

e menos tóxicos ou compostos que podem ser utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes aos dos compostos originais (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). A descoberta de fontes naturais envolve uma abordagem multidisciplinar combinando técnicas botânicas, fitoquímicas, biológicas e moleculares (SEN e SAMANTA, 2014).

Neste contexto, surge a fitoterapia. A diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico. A OMS define planta medicinal como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”. Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária, em sua portaria no. 6 de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto final acabado, embalado e rotulado.” (VEIGA JUNIOR e PINTO, 2005).

Em 2016, o tamanho global do mercado de fitoterápicos foi avaliado em US\$ 71,19 bilhões segundo o Hexa Research (2018). Mas, de acordo com a literatura, mesmo o mercado mundial de fitoterápicos sendo bastante promissor e a diversidade genética vegetal mundial expressiva, poucas espécies (15 a 17%) têm sido cientificamente estudadas para a avaliação de suas qualidades, segurança e eficácia (BAGATINI et al., 2007; SEN e SAMANTA, 2014; SPONCHIADO et al., 2016).

O Brasil, por exemplo, tem cerca de 10% da flora mundial, sendo sua biodiversidade muito ampla com várias espécies de plantas medicinais brasileiras com uma longa tradição de uso com grande potencial fitoterápico (MAZZOLIN et al., 2010). No entanto, menos de 1% das espécies vegetais foram investigadas quanto a propriedades químicas e/ ou farmacológicas (SEN e SAMANTA, 2014). Além disso, apesar do mercado mundial de medicamentos à base de plantas estar se expandindo, isso não acontece no Brasil quando se considera o número de produtos licenciados. De acordo com um revisão recente publicada por Carvalho et al. (2017), existem 101 espécies de plantas licenciadas como ingredientes farmacêuticos ativos no Brasil. Segundo a “Flora do Brasil”, 8 são endêmicas nativas, 19 nativas não endêmicas, 6 são

naturalizadas, 6 são cultivadas e 62 não são originárias do Brasil. Estes dados mostram que apenas 38,6% do total de espécies de plantas licenciadas podem ser obtidas em solo brasileiro. Entre elas, somente 27 são nativas (26,7%). Mas, embora o número de produtos e empresas produtoras tenha diminuído, não houve redução nos valores de mercado. Durante 2015, US\$ 554,5 milhões em medicamentos à base de plantas foram comercializados no Brasil. Esses números representam um aumento de 6% em relação a 2014, segundo Lazarinni (2015), com dados obtidos do IMS Health, empresa que presta serviços de consultoria em marketing farmacêutico (CARVALHOS et al., 2017).

Um fato importante é que, no Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos anos, pois muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes ou pela presença de contaminantes ou adulterantes nas preparações fitoterápicas, exigindo um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta da planta, extração de seus constituintes, até a elaboração do medicamento final. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem elaborando normas para a regulamentação destes medicamentos, desde a Portaria n. 6 de 1995, que estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos, passando pela RDC n. 17 de 2000, e a Resolução RDC n. 48 de 16 de março de 2004, atualmente em vigor, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Isso por que, a toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente (VEIGA JUNIOR e PINTO, 2005). Algumas plantas medicinais são, inclusive, incompatíveis com o uso de certos medicamentos (FERREIRA et al., 2010). Assim, o grande uso de medicamentos à base de plantas medicinais e o próprio conhecimento popular trazem a necessidade e importância de estudos multidisciplinares, associando fitoquímicos e farmacólogos, para que sejam ampliados os conhecimentos dos potenciais terapêuticos e tóxicos de extratos vegetais (VEIGA JUNIOR e PINTO, 2005; FIRMO et al., 2011).

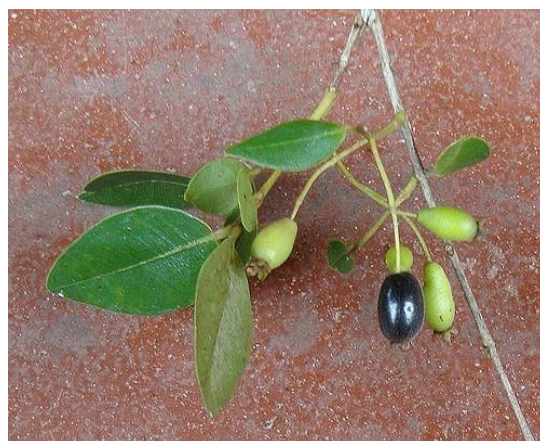
Frente a tudo isso e devido ao fato de que a busca por novas terapias tem impulsionado a pesquisa para se concentrar em plantas medicinais e produtos naturais (ROZZA et al., 2015), no Projeto Biota-FAPESP (Proc. No. 09/52237-9) sob a coordenação do Prof. Dr. Wagner Vilegas, foram estudados extratos e infusos de mais

de 30 espécies de plantas pertencentes a 16 gêneros e 11 famílias do cerrado dos Estados de São Paulo, Tocantins e Mato Grosso. Dentre as plantas estudadas no Projeto Biota, destacamos *Myrcia bella* e *Bauhinia holophylla*.

Espécies do gênero *Myrcia* têm sido utilizadas na medicina popular como adstringentes, diuréticos, para estancar hemorragias, no tratamento de hipertensão, úlceras e diabetes, segundo o conhecimento empírico indígena e africano (JORGE et al., 2000. VAREDA et al., 2014; SALDANHA et al., 2013; SANTOS et al., 2018). As plantas conhecidas como "pedra-hume-caá" é um dos maiores gêneros da família Myrtaceae com cerca de 760 espécies e bem representado em todo o território brasileiro. A família Myrtaceae possui 133 gêneros e mais de 3.800 espécies, com dois centros principais de desenvolvimento na América tropical e na Austrália, embora ocorram em outras regiões do mundo (VAREDA et al., 2014). É uma das mais características da flora brasileira, apresentando potencial e significativo interesse econômico para o Brasil. Entre suas espécies são encontrados vegetais medicinais, ornamentais, produtores de madeiras e de frutos comestíveis (JORGE et al., 2000).

M. bella Cambess (Figura 1) é uma espécie comum e importante em muitos fragmentos de savana (Cerrado) distribuídos no estado de São Paulo. Vareda et al. (2014) confirmaram que os extratos de folhas de *M. bella* possuem atividade hipoglicemiante e hipolipidêmica, agindo na diminuição da glicemia, possivelmente pela captação e armazenamento de glicose pelo fígado. Serpeloni et al. (2015) verificaram a atividade citotóxica, antioxidante e antimutagênica pelo teste do micronúcleo do extrato hidroalcolico de *M. bella* em células gástricas normais e tumorais e os resultados obtidos mostraram que altas concentrações do extrato induzem citotoxicidade e morte celular por necrose. Além disso, sua atividade antioxidante pode ser responsável, em parte, pelos efeitos antimutagênicos observados e pelos efeitos protetores contra distúrbios gastrointestinais previamente descritos para essa espécie vegetal. Recentemente, Santos et al. (2018) também demonstraram sua promissora atividade antioxidante, além das atividades antiproliferativa e antimicrobiana contra *Escherichia coli*. De acordo com Saldanha et al. (2013), essa espécie possui ácidos fenólicos como ácido caféico, galato de etila, ácido gálico, ácido quínico, flavonoides glicosilados, acilados derivados de quercetina e miricetina. Santos et al. (2018) encontraram o ácido elágico como principal constituinte.

Figura 1 - Folhas e frutos de *Myrcia bella*



Fonte: <http://www.ufjf.br/floraserranegra/herbario-virtual/angiospermas/myrtaceae/myrcia-rupicola-d-legrand/>

Sobre o gênero *Bauhinia* (Leguminosae), suas espécies apresentam tipicamente uma grande distribuição em regiões tropicais tais como Ásia, África e América do Sul, por isso adaptaram-se bem ao clima brasileiro (PINHEIRO et al., 2017). Várias delas têm sido amplamente utilizadas no tratamento de várias condições, como infecções, dor e úlcera gástrica (ROZZA et al., 2015; BEBER et al., 2017; PINHEIRO et al., 2017). No entanto, o mais relevante é que extratos de folhas, raízes ou sementes têm sido utilizados, através dos tempos, pela medicina popular de praticamente todas as populações humanas no tratamento de diabetes. O mais antigo registro de estudo clínico do uso de *Bauhinia* como planta antidiabética foi feita por Juliani (1931).

São popularmente conhecidas como "miroró, pata-de-vaca, pata-de-anta", pois suas folhas são na maioria inteiras e algumas parcialmente divididas no ápice em dois lobos ovais (lembrando pata de vaca), palminérveas com nove nervuras principais (Figura 2). Originário do Cerrado brasileiro, *B. holophylla* é um vegetal arbustivo, atingindo de 1 a 5 m de altura em sua fase adulta, apresentando caule não muito lenhoso e ramos finos (BICALHO et al., 2005).

Figura 2 - Folhas bilobuladas de *Bauhinia* sp



Fonte: Série Produtor Rural, nº 60, USP, Plantas medicinais: Patas de vacas

De acordo com a literatura, plantas do gênero *Bauhinia* apresentam flavonoides na forma de agliconas e heterosídeos de flavonoides, assim como outras classes de compostos orgânicos de interesse medicinal, incluindo terpenoides, esteroides, taninos e quinonas (ROZZA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017).

Com relação ao potencial farmacológico e biológico de *B. holophylla*, poucos estudos estão descritos na literatura. Rozza et al. (2015) demonstraram o efeito antiulcerogênico do extrato hidroalcoólico das folhas de *B. holophylla*. De acordo com os autores tal efeito ocorre principalmente pela diminuição do estresse oxidativo e atenuação da resposta inflamatória. Além disso, o extrato induziu um efeito antidiarreico e não houve sinais de toxicidade. Neste estudo, foram identificados e isolados dois heterosídeos de miricetina, um heterosídeo de quercetina, um heterosídeo de kaempferol, um heterosídeo de luteolina e uma aglicona de isorhamnetina. O alto teor de fenóis totais no extrato hidroalcoólico de *B. holophylla* está relacionado com melhores resultados nos testes de atividade antioxidante, visto que o extrato aumentou a atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) e da glutathione redutase (GR) e reduziu o nível de glutathione (GSH).

Ribeiro et al. (2017) verificaram que concentrações maiores que 7,5 µg/mL do extrato de *B. holophylla* são citotóxicas, induzem apoptose e causam efeitos antiproliferativos, mas não induzem micronúcleos e reduzem células apoptóticas e micronucleadas em tratamentos associando o extrato com um indutor de danos no DNA, o benzo[*a*]pireno. Os resultados também foram atribuídos a presença de flavonoides. Mas, em uma pesquisa recente, Pinheiro et al. (2017) mostraram que o tratamento com

B. holophylla não interferiu nos níveis de glicose no sangue de ratos diabéticos e não causou hipoglicemia em ratos não diabéticos. Os autores justificam a ausência de uma ação efetiva, à dose administrada, método de extração, curto período de tratamento e diferença de sensibilidade entre as plantas utilizadas e os animais testados. Ainda neste estudo alertam sobre os efeitos inconvenientes encontrados, como uma possível lesão hepática, devido ao aumento das atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), além da diminuição do peso corporal, reforçando o possível efeito tóxico da planta. Dessa maneira, salientam que o consumo de *B. holophylla* requer um cuidado especial.

1.2. Importância da busca de novos antimicrobianos

O rápido surgimento de fungos patogênicos resistentes a múltiplos fármacos e de bactérias resistentes a antibióticos representam juntos uma ameaça considerável ao controle de doenças em diversos sistemas antropogênicos (FISHER et al., 2018).

Tendo em vista a importância deste problema de saúde pública mundial com consequências clínicas e econômicas preocupantes, várias organizações, como a Comissão Européia, Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), Organização Mundial da Saúde (OMS), dentre outros, reconheceram a relevância do estudo da emergência da resistência microbiana e do desenvolvimento de sistemas de vigilância e controle (LOUREIRO et al., 2016). A Comissão Européia, por exemplo, criou o Sistema Europeu de Vigilância da Resistência Microbiana (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System – EARSS*), que é uma rede de sistemas nacionais de vigilância destinados a recolher dados de resistência comparáveis e confiáveis. O objetivo da EARSS é documentar as variações na resistência antimicrobiana ao longo do tempo e local e fornecer a base para avaliar a eficácia dos programas de prevenção e decisões políticas (BRONZWAER et al., 2002; EARSS, 2010).

No Brasil, a ANVISA lançou recentemente o Plano Nacional para Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde elaborado pela Gerência de Tecnologia em Serviços de Saúde (GGTES), a fim de contribuir no enfrentamento desse grave problema através do estabelecimento de estratégias nacionais que promovam a

detecção, prevenção e redução da resistência microbiana nos serviços de saúde do país (ANVISA, 2017).

Com relação a resistência bacteriana, o desenvolvimento de cepas multirresistentes é decorrente da disseminação de material genético transferível, incluindo plasmídeos, transposons e integrons. Além disso, a combinação desses genes com genes de resistência codificados cromossomicamente frequentemente resulta em bactérias que são resistentes a todas as principais classes de antimicrobianos disponíveis (ALLOCATI et al., 2013). Apesar de ser um fenômeno natural resultante da pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos, o aumento do consumo destes fármacos e seu uso inadequado estão entre os fatores que mais aceleram esse processo (BRONZWAER et al., 2002; LOUREIRO et al., 2016). Por isso, a grande preocupação com a hospitalização prolongada e o uso de diferentes antibióticos de primeira linha que aumentam, de forma acentuada, os custos dos cuidados com a saúde e que constitui um problema particularmente relevante, considerando os recursos finitos que sustentam os sistemas de saúde (LOUREIRO et al., 2016).

Como este fenômeno afeta mundialmente de maneira significativa a eficácia e a utilização de antibióticos, tanto a nível comunitário como hospitalar, em fevereiro de 2017, a OMS publicou sua primeira lista de patógenos resistentes a antibióticos para os quais novos antimicrobianos são necessários com urgência (KUMAR et al., 2018). As bactérias Gram-positivas mais resistentes aos antibióticos são da espécie *Staphylococcus aureus* e do gênero *Enterococcus* e das bactérias Gram-negativas, as espécies *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e da família *Enterobacteriaceae* (OMS, 2017).

Uma situação paralela é a resistência a fungicidas. A taxa global de mortalidade por doenças fúngicas agora excede a da malária e do câncer de mama e é comparável à da tuberculose e do HIV. Estimativas recentes indicam que mais de 300 milhões de pessoas são afetadas por doenças fúngicas graves em todo o mundo, resultando em 1,6 milhão de mortes anualmente (GEDDES-MCALISTER e SHAPIRO, 2018; FISHER et al., 2018). Mesmo assim, apesar de sua onipresença, infecções fúngicas têm sido muito negligenciadas em relação a outras classes de doenças infecciosas (FISHER et al., 2018).

A infecção invasiva por *Candida* representa a infecção mais comum em hospitais em todo o mundo e tem uma mortalidade atribuível de 35% a 60%, causando

um grande impacto econômico e na saúde pública, devido ao alto custo de assistência médica e tempo prolongado de hospitalização. Entre as espécies patogênicas, *C. albicans* é a mais comum, embora um número crescente de novos casos de espécies não-*C. albicans* tenham sido detectados. *C. glabrata*, por exemplo, foi identificada como a segunda causa mais comum de infecções fúngicas invasivas na América do Norte e a quarta em ordem de classificação na América Latina. *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* têm apresentado prevalência aumentada em todo o mundo, assim como espécies mais raras, como *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. rugosa* e *C. famata* (CORREIA et al., 2016).

Em geral, os mecanismos intrínsecos e adquiridos de resistência de patógenos fúngicos estão associados à diminuição da concentração efetiva da droga, alteração do alvo do fármaco ou desvio da toxicidade antifúngica por modificação metabólica. Como as células fúngicas eucarióticas compartilham uma estreita relação evolutiva com seus hospedeiros humanos, o desenvolvimento de drogas antifúngicas apresenta um desafio único para a indústria farmacêutica, uma vez que, os agentes antifúngicos devem ter como alvo a célula fúngica eucariótica, assegurando ao mesmo tempo danos limitados à função celular humana durante o tratamento (GEDDES-MCALISTER e SHAPIRO, 2018).

Aumentando ainda mais a gravidade do problema, a resistência microbiana não atinge somente a saúde humana, mas também a saúde animal e em setores com fins econômicos e comerciais. A migração contínua de pessoas entre países, o turismo internacional e viagens de negócios, por exemplo, desempenham um papel importante na aquisição e disseminação de cepas resistentes a múltiplas drogas (ALLOCATI et al., 2013).

Diante do exposto, as plantas medicinais, usadas tradicionalmente em todo mundo em tratamentos alternativos à medicina tradicional e que demonstram em diversos estudos exercer atividade biológica, justifica o estudo de uma potencial atividade antimicrobiana (CORREIRA et al., 2016). Associado a isso, surge a nanotecnologia que apresenta uma resposta promissora à resistência antimicrobiana, estimulando a inovação para criar uma nova geração de tratamentos (KUMAR et al., 2018).

1.3. Nanotecnologia

O século XX testemunhou um notável crescimento no desenvolvimento de medicamentos, no entanto, muitos destes são lipofílicos ou com baixa solubilidade aquosa, o que limita a sua eficácia e biodisponibilidade. Assim, surgiu o conceito de sistema de administração de medicamentos para minimizar os efeitos colaterais tóxicos, ampliar sua aplicação, expandir os modos de administração e resolver os problemas de absorção. A solubilização, o encapsulamento e a liberação desses fármacos usando sistemas de base aquosa e biocompatíveis provavelmente fornecerão melhor absorção, por meio de menor dose, menor frequência de administração e melhor índice terapêutico (GUPTA e MOULIK, 2007).

Em vista dessas vantagens, este mesmo raciocínio também se voltou aos produtos naturais. A maioria dos constituintes biologicamente ativos de extratos, por sua vez, tais como flavonoides, taninos e terpenóides, são altamente solúveis em água, mas têm baixa absorção, pois são incapazes de atravessar as membranas lipídicas das células, devido ao alto peso molecular, resultando em perda de biodisponibilidade e eficácia, os excluindo, dessa maneira, de serem usados clinicamente (BONIFÁCIO et al., 2014).

Neste contexto, várias estratégias nanotecnológicas, como nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos, sistemas de cristais líquidos, sistemas precursores de cristais líquidos, lipossomas e microemulsões, tem sido combinadas com produtos naturais para potencializar a ação de extratos de plantas, reduzir a dose necessária e os efeitos colaterais e melhorar a atividade (GHOSH et al., 2013; RAJENDRAN et al., 2013). Esses sistemas permitem que substâncias com propriedades diferentes sejam utilizadas na mesma formulação, podendo alterar as propriedades e o comportamento de uma substância em um ambiente biológico. Além disso, os novos sistemas de administração de fármacos têm a capacidade não só de aumentar a seletividade e a eficácia dos componentes ativos, como também de proteger contra a degradação térmica ou fotodegradação e controlar a liberação dos constituintes ativos (MAINARDES et al., 2006; GRILL et al., 2009; VENUGOPAL et al., 2009).

Bonifácio et al. (2015), por exemplo, mostraram que o sistema lipídico nanoestruturado (SLN) pode ser utilizado como estratégia para melhorar o potencial anti-*C. albicans* de extratos etanólicos 70% (EtOH 70%) de *Astronium* sp, pois de

acordo com os resultados potencializou significativamente a atividade antifúngica *in vivo* e *in vitro*.

No que diz respeito aos sistemas para administração de fármacos, várias vantagens estão associadas às microemulsões, como melhora da solubilização da droga, proteção contra hidrólise enzimática, aumento da absorção devido à permeabilidade induzida pelo surfactante, aumento da penetração de substâncias hidrofílicas, hidrofóbicas e anfifílicas, aumento da mobilidade do fármaco o que melhora a biodisponibilidade de drogas hidrofóbicas e modificação favorável da atividade terapêutica de drogas. As microemulsões atuam como super solventes de um medicamento. Eles podem solubilizar drogas hidrofílicas e lipofílicas, incluindo drogas que são relativamente insolúveis em solventes aquosos e hidrofóbicos. Isso se deve à existência de microdomínios de diferentes polaridades dentro da mesma solução monofásica (KAUR e MEHTA, 2017).

Por definição, microemulsão é um sistema termodinamicamente estável e isotropicamente translúcido de dois líquidos imiscíveis, frequentemente água e óleo, em que uma droga ou óleo lipofílico é disperso em uma solução aquosa/ambiente hidrófilo (ou vice-versa), estabilizado por uma película interfacial de surfactantes. Essas condições geram um sistema coloidal da fase interna na ordem de nanômetros (nm). As substâncias ativas podem ser veiculadas nas microemulsões quando são solubilizadas na fase oleosa ou aquosa (OLIVEIRA et al., 2001; 2002). Dessa maneira, além de melhorar a solubilidade, modular a estabilidade ou perfil de biodisponibilidade como já mencionado, proporciona ação prolongada em tecidos ou órgãos do organismo (SINTOV e SHAPIRO, 2004), sendo então considerado um veículo líquido ideal para liberação de fármacos, devido à sua formação espontânea, estabilidade termodinâmica, natureza dinâmica e alta flexibilidade do filme interfacial, tornando uma ferramenta atraente para a entrega de fármacos (IDREES et al., 2011; FARGHALY et al., 2017).

Objetivos

Devemos amar não apenas de coração, pois um dia ele para.

Devemos amar de alma, pois ela é eterna. (Gabriel Marena)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito toxicogénico e a atividade antimicrobiana de extratos EtOH 70% de folhas de *M. bella* e *B. holophylla* incorporados e não incorporados em microemulsões.

2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver e caracterizar um sistema lipídico nanoestruturado (SLN) para a incorporação dos extratos de *M. bella* e *B. holophylla*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos incorporados e não incorporados, pela técnica de diluição em microplacas;
- Determinar a citotoxicidade in vitro dos extratos incorporados e não incorporados em fibroblastos normais (GM-07492) e células de adenocarcinoma cervical humano (HeLa) e carcinoma hepatocelular humano (HepG2);
- Avaliar a atividade mutagênica dos extratos incorporados, por meio de ensaios de mutação gênica reversa com *S. typhimurium* (teste de Ames), utilizando as linhagens TA98, TA100 e TA102, em ausência e presença de metabolização, a fim de verificar a alteração no padrão de mutagenicidade previamente observado;
- Monitorar a liberação controlada dos extratos incorporados e não incorporados através de membranas de diálise.

Materiais e métodos

Não se deixe levar pelas batalhas sombrias e incongruentes de muitos em sua volta. Faça que estes muitos se deixem levar pela sua vasta e incalculável PAZ. (Gabrielarena)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção e procedência das amostras vegetais

Os extratos avaliados neste estudo, bem como as informações sobre a sua composição química foram fornecidos pelo Instituto de Botucatu, UNESP, campus Botucatu-SP, sob a coordenação da Profa. Dra. Anne Lígia Dokkedal Bosqueiro.

3.1.1. *B. holophylla* (Bong.) Steud (Fabaceae)

B. holophylla (Bong.) Steud foi coletada em abril de 2010, no Jardim Botânico Municipal de Bauru (22°20'30'' S e 49°00'30'' W), São Paulo, Brasil. A planta foi identificada no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro pela Prof.^a Dr.^a Ângela Maria Studart da Fonseca Vaz. Cinco ramos férteis foram utilizados para identificação e herborização. Exsicatas foram incluídas no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, sob números de registro RB 507.043, RB 507.045, RB 507.046, RB 507.47 e RB 507.048.

3.1.2. *M. bella* Cambess. (Myrtaceae)

M. bella Cambess foi coletada no Jardim Botânico Municipal de Bauru, localizado às margens da rodovia Comandante João Ribeiro de Barros - SP 225 (22°20'30" S e 49°00'30" W), em novembro de 2010 e identificada pelo Prof. Dr Marcos Eduardo Guerra Sobral, da Universidade Federal de São João Del-Rei, Departamento de Ciências Naturais. Exsicatas (*vouchers* químicos) foram incluídas no herbário da FC/UNESP (UNBA) sob número de registro 5508.

3.2. Preparação dos extratos EtOH 70%

Os extratos foram preparados segundo Prista (1995), a fim de obter amostras padronizadas das diferentes espécies de plantas.

Após separar as partes das plantas selecionadas para o estudo, estas foram secas em estufa a 40°C, moídas em moinhos de facas, sendo posteriormente pesadas, embaladas, etiquetadas e armazenadas em local seco.

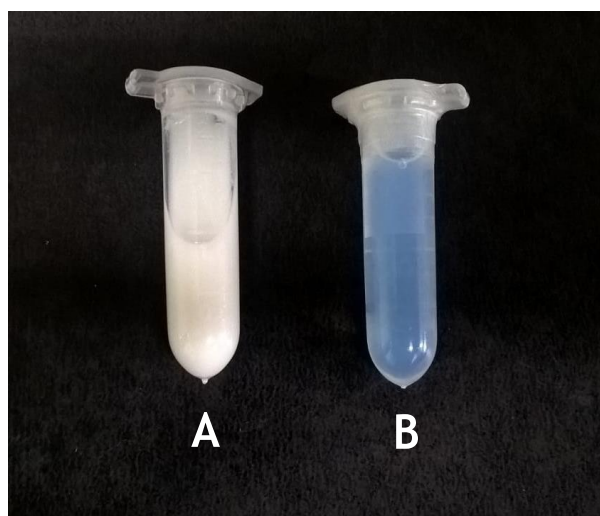
O material vegetal foi submetido à percolação com EtOH 70% (PRISTA, 1995), ou seja, o material moído foi previamente intumescido com etanol 70% (v/v) durante 2 horas fora do percolador. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + etanol 70%), sendo o empacotamento feito da forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. A altura do enchimento obedeceu a proporção 5:1 (cada 5 referente ao percolador 1 do pó da espécie) em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolador foi ajustada entre 1,0 e 2,0 ml/min/Kg de material vegetal comum tamanho médio de partícula de 1 a 3 mm. Todos os extratos foram evaporados sob pressão reduzida em temperatura de 40°C, liofilizados para completa remoção da água e armazenados em frascos âmbar vedados. Após esse processo foi determinado o rendimento do extrato.

3.3. Desenvolvimento dos sistemas lipídicos nanoestruturados

O desenvolvimento e caracterização dos SLNs e a incorporação dos extratos foram realizados no Laboratório de Farmacotécnica (Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP) em colaboração com a pós-doutoranda Patrícia Bento da Silva, sob supervisão do Prof. Dr. Marlus Chorilli.

Para o desenvolvimento das microemulsões, utilizou-se a metodologia baseada nos trabalhos de Bonifácio et al. (2015) e Formariz et al. (2010), com adaptações. Os extratos foram incorporados em duas formulações; ambas possuem como tensoativo, uma mistura de polioxietileno 20 cetil éter (Brij® 58) e fosfatidilcolina de soja na proporção 2:1 e como fase aquosa *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pH 7,4. O que difere é que uma possui o óleo de semente de uva (OSU) e colesterol na proporção de 5:1 como fase oleosa (SLN1) e a outra somente o colesterol (SLN2) (Figura 3).

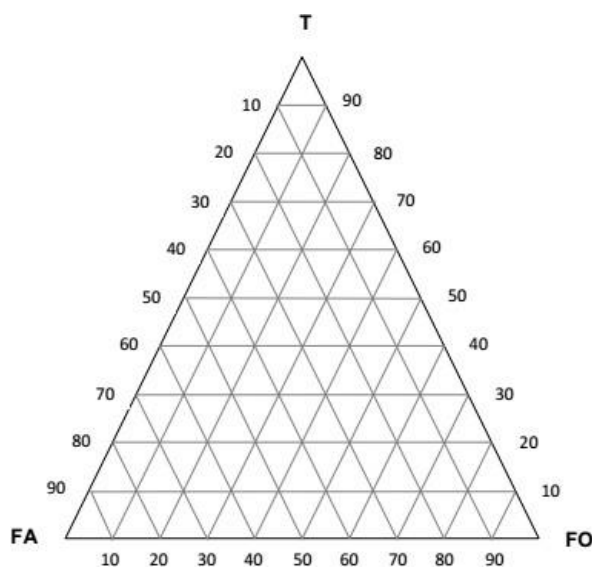
Figura 3 – Aspectos dos Sistemas Lipídicos Nanoestruturados SLN1 (A) e SLN2 (B)



Fonte: Autor

Com esses constituintes, foi, então, construído um diagrama de fases (Figura 4), fixando-se a proporção de tensoativo e fase oleosa, e procedendo a titulação com a fase aquosa, seguida de inspeção visual do resultado da mistura dos componentes, obtendo, dessa maneira, 36 diferentes formulações.

Figura 4 - Diagrama de fases



As misturas foram sonicadas usando sonicador de haste (Q500 da QSonica®), potência de 500 watts, amplitude de 20%, modo descontínuo, por 10 minutos com

intervalo de 30 segundos a cada 59 segundos de sonicação, com banho de gelo durante todo o processo de sonicação.

Consequentemente, obteve-se pontos com diferentes aspectos de acordo com a variação das fases. Assim, as regiões dos sistemas foram classificadas visualmente como sistemas viscosos ou líquidos opticamente translúcidos ou opacos, ou ainda separação de fases. Desse modo, foi possível delimitar as diferentes regiões no diagrama de fases, para então, selecionar a região do sistema para a incorporação dos extratos.

3.4. Caracterização do sistema lipídico nanoestruturado

3.4.1. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O diâmetro médio das gotículas, o índice de polidispersidade (IPD) e o potencial Zeta (PZ) foram obtidos através da análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS – Dynamic Light Scattering) usando o equipamento Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Este equipamento é particularmente sensível para determinar pequenas mudanças no diâmetro médio, tais como aquelas devido às camadas adsorvidas na superfície da partícula ou pequenas variações no processo de manufatura. Quando um feixe de luz é lançado através de uma dispersão coloidal, as partículas ou gotas são capazes de espalhar a luz em todas as direções, permitindo que flutuações tempo-dependentes na intensidade do espalhamento através de um detector que processa os dados e envia a um computador. A partir dessa técnica, calculou-se o raio hidrodinâmico das partículas coloidais da equação de Stokes-Einstei:

$$D = KT/6\pi\eta Rh$$

sendo que: D: coeficiente de difusão das partículas; K: constante de Boltzmann ($1,3807 \times 10^{-23} \text{ NmK}^{-1}$); T: temperatura absoluta (293,15 K); π : 3,141592; η : viscosidade ($1,002 \times 10^{-3} \text{ NM}^{-2}\text{s}$); Rh: raio hidrodinâmico.

As formulações foram analisadas na célula eletroforética (Figura 5) de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. A temperatura do sistema foi mantida a 25°C, o comprimento de onda do laser foi de 532 nm e o índice de refração de acordo com o índice observado para cada amostra analisada. Foram

realizadas 3 determinações do diâmetro hidrodinâmico médio e do IPD das gotículas de cada amostra que é uma medida da largura da distribuição do tamanho da gotícula (OBEIDAT et al., 2010).

O PZ foi realizado por determinação da mobilidade eletroforética do SLN. Essa análise reflete a carga elétrica na superfície da gotícula, indicando a estabilidade física de um sistema coloidal (OBEIDAT et al., 2010). Antes da medição, todas as amostras foram previamente diluídas (100 μL da amostra em 900 μL de água destilada) para produzir uma intensidade de dispersão adequada. Foram realizadas, para cada amostra, 3 determinações do potencial de superfície, calculando-se a média e o desvio padrão.

Figura 5 - Célula eletroforética



Fonte: Autor

3.4.2. Espectroscopia de absorção no Infravermelho (FTIR)

As amostras foram analisadas em um equipamento Agilent Cary 630 acoplado a um módulo ATR (detector de refletância atenuada). A faixa de varredura usada nas análises foi de 650 a 4000 cm^{-1} . As saídas espectrais foram registradas no modo de transmitância em função do número de onda.

3.5. Preparo das amostras para a realização dos ensaios biológicos

Para a realização dos ensaios antimicrobianos, os extratos foram solubilizados em 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 80% de Caldo Mueller Hilton (CMH) para avaliação da atividade antibacteriana ou 80% de meio de cultura *Roswell Park*

Memorial Institute (RPMI 1640) para a atividade antifúngica na concentração de 4000 µg/mL. Já para avaliação da citotoxicidade, os extratos foram preparados em uma concentração de 2000 µg/mL contendo 2% de DMSO.

Para a incorporação no SLN1, os extratos vegetais foram pesados e preparados na mesma concentração; inicialmente foram solubilizados no OSU com baixa sonicação e então adicionado o PBS, tensoativo e colesterol. No SLN2, os extratos pesados foram solubilizados na fase aquosa seguido de baixa sonicação e depois adicionado o tensoativo e o colesterol. Após a adição de todos os constituintes, ambos foram sonicados em modo descontínuo por 10 minutos com 30 segundos de intervalo a cada 59 segundo de sonicação.

Para citotoxicidade, as amostras incorporadas que inicialmente estavam em uma concentração de 4000 µg/mL foram diluídas em meio de cultura completo até a concentração de 100 µg/mL de extrato com 2% das bases dos sistemas.

De maneira semelhante, procedeu-se para a avaliação da mutagenicidade. No entanto, a concentração de extratos incorporados foi de 5000 µg/mL e quando necessário esta preparação foi diluída em tampão fosfato.

3.6. Meios de cultura e soluções

A composição e o preparo dos meios de cultura e soluções utilizados nos ensaios estão descritos no anexo I deste trabalho.

3.7. Atividade antimicrobiana

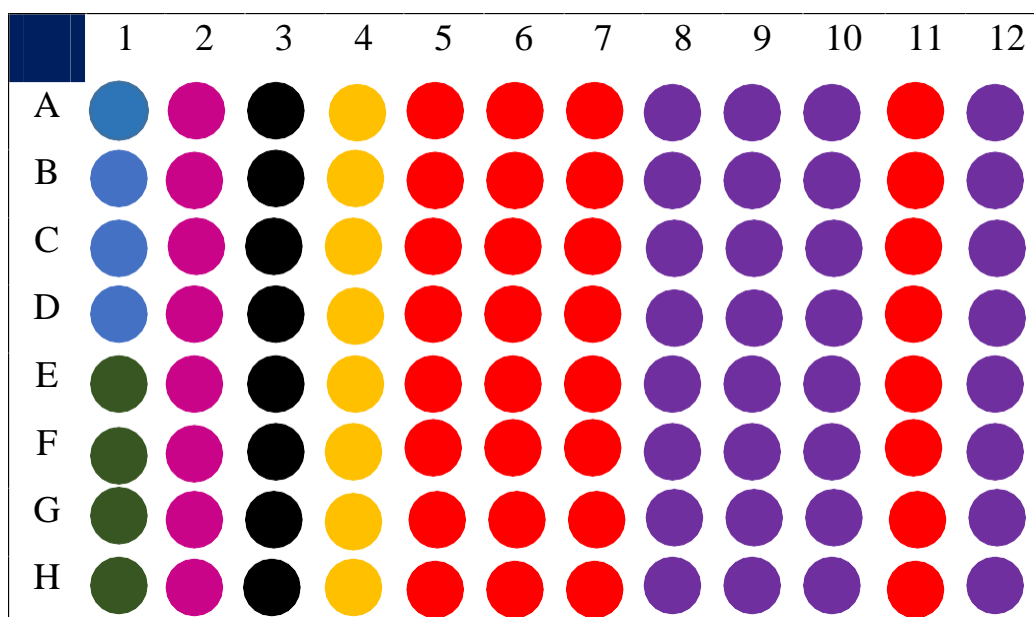
Os ensaios antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos (Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP), em colaboração com o aluno de doutorado Matheus Aparecido dos Santos Ramos, sob supervisão da Profa. Dra. Taís Maria Bauab.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pela técnica de diluição em microplacas, obedecendo-se a norma M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) e Duarte et al. (2005), com modificações para

avaliação do potencial antifúngico e a norma M7-A7 também do CLSI (CLSI, 2006), para avaliação do potencial antibacteriano.

O esquema de como foram realizados os testes antimicrobianos está representado na Figura 6.

Figura 6 - Esquema de organização do teste antimicrobiano em microplaca



● Controle de crescimento

● Controle de esterilidade do meio

● Controle positivo

● DMSO

● Base

● Extrato não incorporado

● Extrato incorporado

Colunas 11-12: Controle de esterilidade das amostras

3.7.1. Amostras microbiológicas

Foram utilizadas as amostras bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram positiva) e de *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram negativa), além das espécies fúngicas de *Candida albicans* ATCC-10231, *C. glabrata* ATCC-2001, *C. krusei* ATCC-6258, *C. parapsilosis* ATCC-22019 e *C. tropicalis* ATCC-750.

3.7.2. Estocagem e manutenção das amostras microbiológicas

As amostras bacterianas foram mantidas em CMH acrescido de 40% de glicerol a -20°C . Para o uso, foram repicadas em 3 mL de CMH e incubadas por 24 horas a 37°C , para padronização do inóculo.

As amostras de *Candida* sp foram mantidas em condições semelhantes, no entanto foi utilizado o caldo sabouraud dextrose (CSD) também acrescido de 40% de glicerol e congeladas a -20°C . Para o uso, as mesmas foram repicadas em 3 mL de CSD e incubadas por 48 horas a 37°C em estufa microbiológica.

3.7.3. Padronização das suspensões microbiológicas

Uma alíquota das culturas bacterianas de 24 horas foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de CMH e ajustada a turbidez com a escala 0,5 de McFarland, seguida de leitura espectrofotométrica a 620 nm até obtenção de absorvância entre 0,10 a 0,15 ($1,0 \times 10^8$ UFC/ mL). Posteriormente, a suspensão foi diluída na proporção 1:10 para obter-se a concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/ mL, que foi, então, utilizada nos ensaios (CLSI, 2006).

Já para as leveduras, uma alíquota das culturas fúngicas de 48 horas foi transferida para um tubo ensaio com 5 mL de CSD e ajustada a turbidez também com a escala 0,5 de MacFarland (aprox. 5×10^6 UFC/mL). Logo após, foi feita a leitura espectrofotométrica a 530 nm até obtenção de absorvância entre 0,12 a 0,15 ($1,0 \times 10^6$ UFC/ mL). Em seguida, a suspensão fúngica foi diluída 1:1000 em CSD e depois 1:20 em RPMI obtendo-se uma suspensão com concentração final de $2,5 \times 10^3$ UFC/ mL utilizada nos experimentos (CLSI, 2008).

3.7.4. Controles

Nos ensaios antibacterianos, como controle positivo foi utilizado a ampicilina, que atua na inibição da síntese de parede celular (TORTORA et al., 2017), em uma concentração de 5 $\mu\text{g/ mL}$ para *S. aureus* e 50 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli*. Como controle negativo/solvente foram utilizados 20% de DMSO em CMH, ou seja, o solvente dos extratos não incorporados e as bases SLN1 e SLN2 como controles dos extratos incorporados. Além disso, foi realizado o controle de crescimento bacteriano e de

esterilidade do meio e dos extratos sem a adição do inóculo bacteriano, a fim de certificar qualquer contaminação.

Nos ensaios antifúngicos, foram utilizados como controles positivos anfotericina B (32 µg/ mL) e o fluconazol (256 µg/ mL). Esses fármacos têm sido usados como primeira escolha na terapêutica de doenças fúngicas por terem como alvo de ação a membrana celular dos mesmos (RAMOS, 2015). Também foi realizado o controle de esterilidade do meio de cultura e extratos vegetais, do crescimento leveduriforme e controle negativo/solvente como descrito acima para a atividade antibacteriana, entretanto, utilizando RPMI.

3.7.5. Atividade antibacteriana - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de CMH e em seguida acrescidos de 100 µL das amostras-teste no primeiro poço para realização da diluição seriada de 2000 a 15,6 µg/ mL. Subsequentemente, foram distribuídos 20 µL das suspensões dos micro-organismos em cada poço, exceto nos poços que correspondem ao controle de esterilidade do meio (apenas CMH) e dos extratos vegetais.

As microplacas foram incubadas à 37°C por 24 horas e após esse período foi realizada a leitura visual do crescimento bacteriano. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A CIM foi determinada para cada cepa bacteriana, como a menor concentração da amostra que inibe o crescimento bacteriano (HORNER et al., 2008; GUDIÑA et al., 2010).

A leitura visual foi realizada após a incubação de 2 horas a 37°C com o revelador resazurina (30 µg/mL), onde foram adicionados 30 µL em cada poço da microplaca. A resazurina é um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de óxido-redução, que tem sido utilizado para avaliar a viabilidade e contaminação bacteriana e para testar a atividade antimicrobiana. A redução do meio com resazurina passa de azul para róseo, permitindo uma análise visual do resultado (PALOMINO et al., 2002; MONTEJANO et al., 2005).

3.7.6. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Antes da adição do revelador resazurina, a mistura de cada poço da microplaca foi repicada, com o auxílio de hastes de madeira estéreis, em uma placa de ágar Mueller Hilton (AMH). Após incubação das placas a 37°C por 24 horas, foi observada a presença ou ausência do crescimento das bactérias. A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) tem como objetivo avaliar a capacidade de reestabelecimento do crescimento bacteriano após incubação de 24 horas de contato com as amostras vegetais.

3.7.7. Atividade antifúngica - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 100 µL de RPMI 1640 (tamponado com MOP's) e em seguida acrescidos de 100 µL das amostras-teste no primeiro poço e então realizado a diluição seriada. Subsequentemente, foram distribuídos 100 µL da suspensão fúngica em cada poço, exceto nos poços que correspondem ao controle de esterilidade do meio (apenas RPMI) e dos extratos vegetais. Assim, as concentrações de extratos avaliadas variaram de 1000 a 0,97 µg/mL. As microplacas foram incubadas à 37°C por 48 horas e após esse período foi realizada a leitura visual do crescimento fúngico. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A CIM foi definida como a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento microbiano (HORNBERG et al., 2008; HAWSER e ISLAM, 1999).

A leitura visual foi realizada após a incubação de 2 horas a 37°C com o revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) 2%, onde foram adicionados 20 µL em cada poço da microplaca. O TTC é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido. Dessa maneira, os resultados foram analisados de acordo com a mudança de coloração, onde os poços que apresentam coloração vermelha indicam a presença de crescimento fúngico, enquanto que aqueles que permanecem incolores indicam a ausência de crescimento fúngico (DUARTE et al., 2005).

3.7.8. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

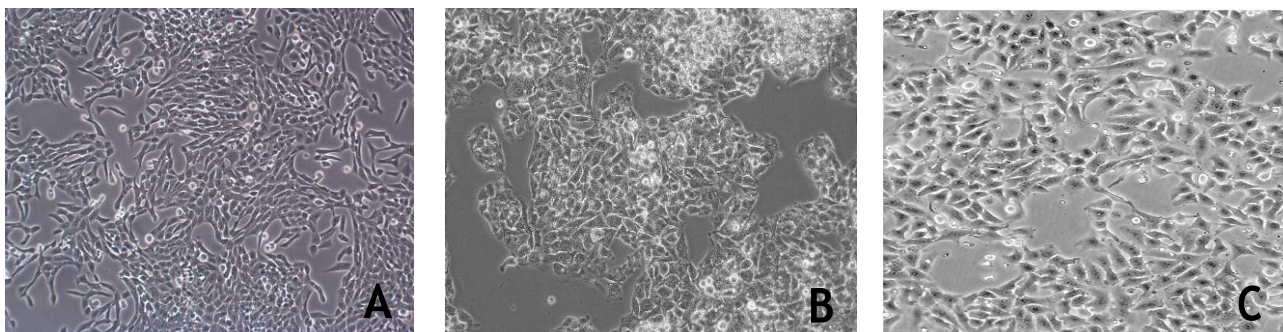
Antes da adição do revelador TCC, a mistura de cada poço da microplaca foi repicada, com o auxílio de hastes de madeira estéreis, em uma placa de ágar sabouraud dextrose (ASD). Após incubação das placas a 37°C por 48 horas, foi observada a presença ou ausência do crescimento das leveduras. A determinação da concentração fungicida mínima (CFM) tem como objetivo avaliar a capacidade de reestabelecimento do crescimento fúngico após incubação de 48 horas de contato com as amostras vegetais.

3.8. Citotoxicidade em linhagens celulares

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Micobacteriologia (Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP), em colaboração com o aluno de doutorado Rone Aparecido de Grandis, sob supervisão do Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan.

Os ensaios *in vitro* para a determinação da viabilidade celular foram realizados frente às linhagens: GM-07492 fibroblastos normais, HepG2 (ATCC HB-8065 TM) células de carcinoma hepatocelular humano e HeLa (ATCC CCI-2TM) células de adenocarcinoma cervical humano (Figura 7). As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modification of Eagle's médium* - Sigma – Aldrich) com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF – Gibco-Invitrogen) e 2,38 mg/mL HEPES (Sigma - Aldrich), constituindo o chamado “meio de cultura completo”, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. 1% de solução antibiótico-antimicótico (estreptomicina, gentamicina e neomicina – Gibco-Invitrogen) foram adicionados ao meio, a fim de prevenir a contaminação bacteriana e fúngica. As culturas foram repicadas semanalmente por tripsinização até um máximo de 10 passagens.

Figura 7 - Fotomicrografias das linhagens celulares GM-07492 (A), HepG2 (B) e HeLa (C)



Fonte: Autor

Fonte:
<http://www.addexbio.com/product-detail?pid=46>

Fonte:
<https://www.atcc.org/products/all/CCL-2.aspx>

Até o momento do uso, as linhagens foram mantidas congeladas (-80 °C) em tubos criogênicos (alíquota) contendo SBF e 5 % de DMSO.

Para o descongelamento das células, o vial criogênico retirado do -80°C permaneceu em temperatura ambiente até que seu conteúdo estivesse completamente descongelado. Este conteúdo foi colocado em um tubo de centrifuga estéril (15 mL) contendo 2 mL de meio de cultura completo e submetido à centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e, ao *pellet* ressuspensionado foi acrescentado 2 mL de meio. A suspensão celular foi transferida para uma nova garrafa de cultivo, a qual foi incubada nas condições previamente descritas até atingir a confluência celular.

Para a tripsinização, após remoção do meio de cultura, as células foram lavadas com PBS e desprendidas da superfície interna do frasco de cultura utilizando-se tripsina (Gibco-Invitrogen). Após o desprendimento das células, 2 mL de meio de cultura completo foi adicionado ao frasco para a inativação da tripsina e homogeneizado. Uma pequena quantidade de células foi, então, colocada em cultivo em novos frascos de cultura contendo 5 mL de meio de cultura completo, e submetidas às condições padronizadas de incubação (37°C, em atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de saturação de umidade) até a preparação da próxima subcultura.

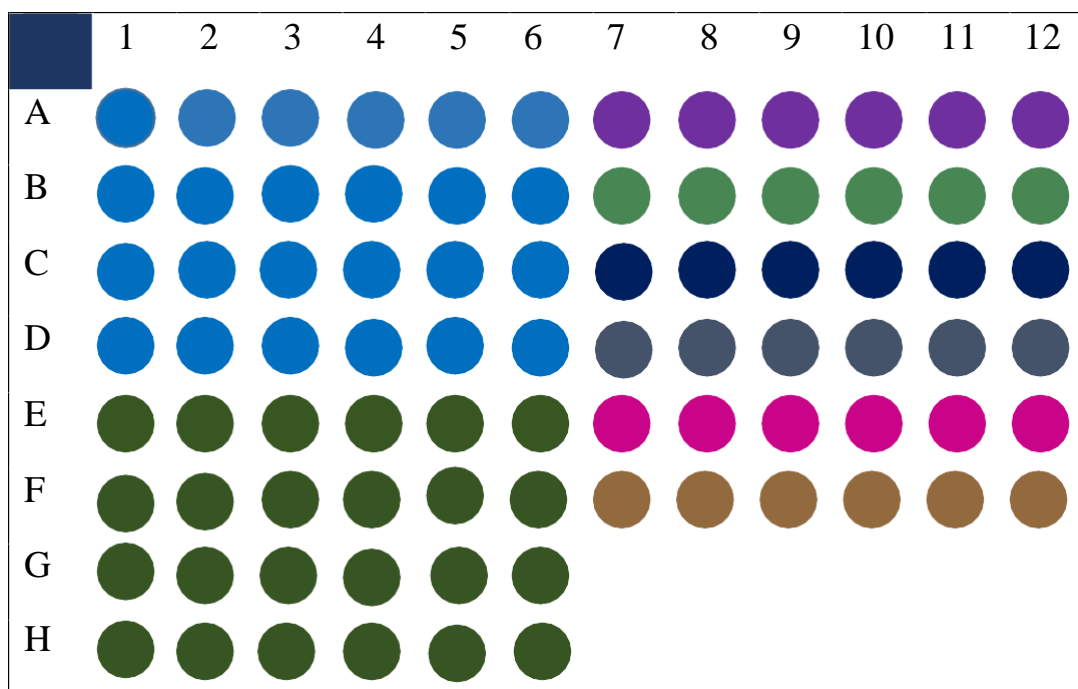
Para a realização do teste, as células foram semeadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de $1,5 \times 10^4$ células/poço seguida de incubação por 24 horas para adesão celular.

Após a incubação, o meio foi removido e as amostras a serem testadas, previamente diluídas nas concentrações de 1000 a 62,5 µg/mL para os extratos não

incorporados e de 50 a 1,5 µg/mL para os incorporados, foram adicionadas aos poços das microplacas (100 µL). Também foram incluídos os controles negativo (meio de cultura completo), positivo (DMSO 20%), solvente (DMSO 1% para os extratos não incorporados e as bases dos sistemas 1% como controle dos extratos incorporados), OSU e tensoativo (0,12 a 0,025%). Os solventes, OSU e tensoativo também passaram por uma diluição seriada antes de entrarem em contato com as células (Figura 8).

Após 24 horas com os diferentes tratamentos, o meio de cultura foi removido e 50 µL de solução aquosa de resazurina a 0,001% foram adicionados. O ensaio de redução da resazurina (alamar Blue®) foi realizado segundo o protocolo descrito por Pagé et al. (1993) e indica o status do perfil metabólico celular. As microplacas foram novamente incubadas (1 hora) e por fim, realizou-se a leitura no leitor de microplacas Cytation (Biotek®), onde foram utilizados filtros de excitação (530 nm) e emissão (590 nm).

Todos os dados foram analisados estatisticamente pelo software GraphPad Prism 5, utilizando análise de variância One-way Anova para determinar as significâncias estatísticas, seguida pelo teste de Dunnet considerando $p < 0,05$. Os testes foram feitos em triplicata e os resultados obtidos foram expressos como uma porcentagem do controle negativo (meio de cultura completo) que foi considerado 100%.

Figura 8 - Esquema de organização do teste de citotoxicidade em microplaca

3.9. Mutagenicidade (Teste de Ames)

Para a avaliação da mutagenicidade foi realizado o teste de Ames, de acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983). Cinco diferentes concentrações dos extratos incorporados foram avaliadas. Os extratos foram incorporados em uma concentração de 5000 µg/ mL e diluídos em tampão fosfato quando a toxicidade foi observada nos testes preliminares. A toxicidade foi evidenciada pela redução no número de revertentes His⁺ ou como um crescimento de fundo (*background*) nas placas teste de ágar mínimo.

No teste, foram utilizadas as linhagens TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*, gentilmente cedidas pela Profa Dra Eliana Aparecida Varanda do Laboratório de Mutagênese da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. As linhagens foram inicialmente adquiridas por meio do Dr. Bruce Ames da Universidade de

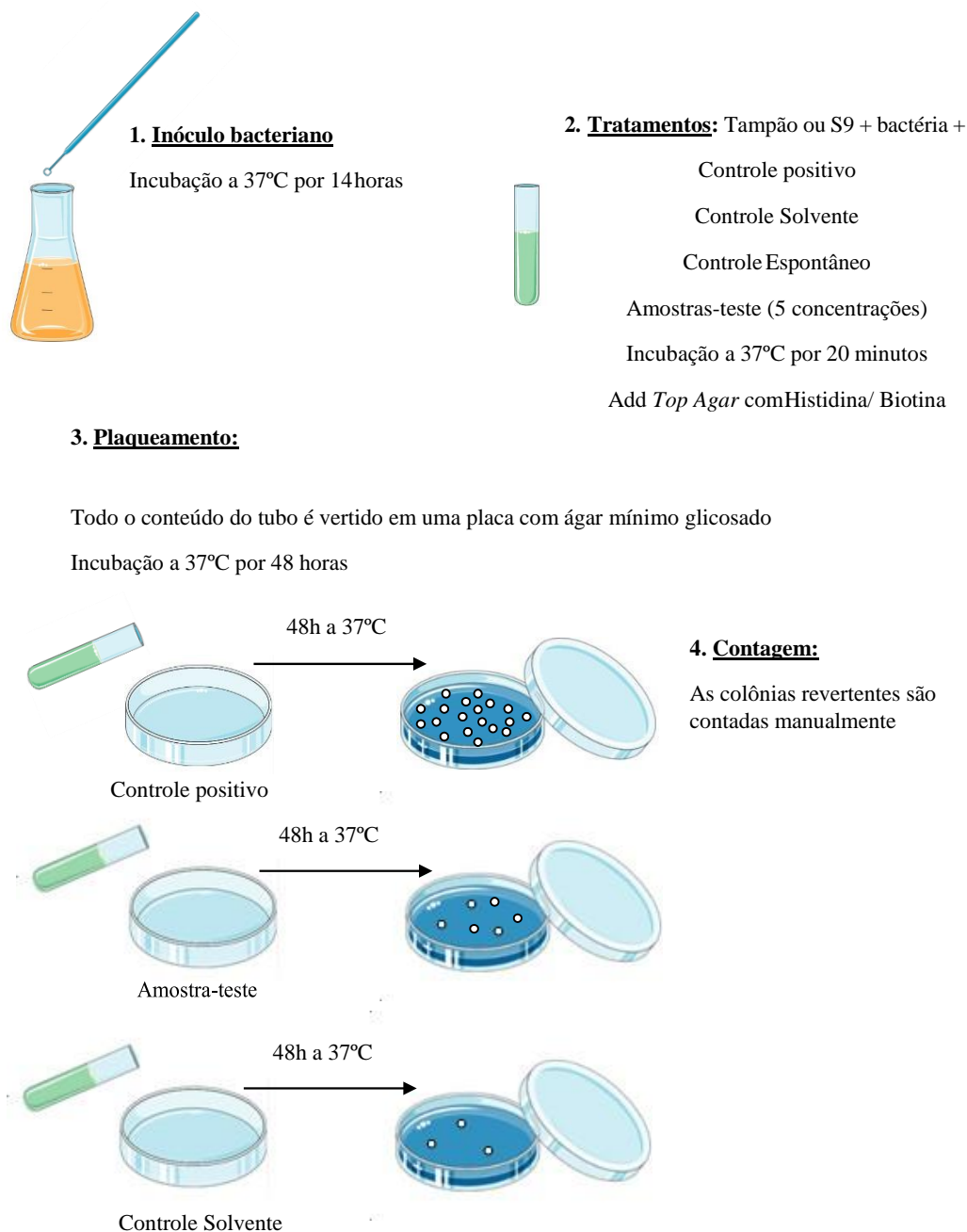
Berkeley, Califórnia, EUA. Os experimentos foram realizados com e sem ativação metabólica.

Nos ensaios com metabolização, foi utilizada a fração microsomal S9 homogeneizada de fígado de rato Sprague Dawley (fração pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas, aroclor 1254- 500 mg/kg) obtida comercialmente da MOLTOX-Molecular Toxicology, Inc. USA. A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. O sistema de ativação metabólica consiste de 4% de fração S9, 1% de 0,4 M de cloreto de magnésio, 1% de 1,65 M de cloreto de potássio, 0,5% de 1 M de glicose-6-fosfato e 4% de 0,1 M de b-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1 M, além de 50% de 0,2 M de tampão fosfato pH 7,4 e 39,5% de água destilada estéril (MARON e AMES, 1983). As soluções foram preparadas sempre a fresco e utilizadas num período máximo de 3 horas.

Para o inóculo bacteriano, com auxílio da alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubada a 37 °C, por 12-16 horas, em *shaker* incubador (37 °C – 160 rpm), de modo a obter uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL.

Para a realização do teste, às concentrações dos extratos incorporados foram adicionados 0,5 mL de 0,2 M de tampão fosfato ou 0,5 mL de 4% de mistura S9 e 0,1 mL de cultura de bactérias, e então incubados a 37°C por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados à mistura 2 mL de *top agar* suplementado com traços de histidina e biotina. Essa mistura foi homogeneizada levemente e plaqueada em ágar mínimo glicosado. Após solidificação do *top agar*, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas (Figura 9). Após esse período, as colônias revertentes foram contadas manualmente. O ensaio foi realizado em triplicata.

Figura 9 – Esquema do Teste de Ames



Fonte: Autor

Os agentes mutagênicos padrões utilizados para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa nos experimentos sem a mistura S9 foram 4- nitro-*o*-fenilenodiamina (10 µg/ placa para TA98), azida sódica (1,25 µg/ placa para TA100) e mitomicina C (0,5 µg/ placa para TA102). 2-aminoantraceno (1,25 µg/ placa)

foi utilizado para TA98 e TA100 e 2-aminofluoreno (10 µg/ placa), para TA102 nos experimentos com ativação metabólica. As bases SLN1 e SLN2 (100 µL/ placa) foram utilizadas como controle solvente. Além disso, foi realizado o controle espontâneo (sem qualquer tratamento), bem como o OSU e tensoativo isoladamente.

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (*U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA*), adotando o modelo de Bernstein et al. (1982). Os dados (revertentes/ placa) foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido de uma regressão linear. O índice de mutagenicidade (IM) foi calculado para cada concentração testada, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{número de revertentes/ placa com o composto-teste (revertentes induzidas)}}{\text{número de revertentes/ placa com o controle (solvente) negativo}}$$

A amostra foi considerada mutagênica quando houve um aumento significativo no número de revertentes e o IM foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

3.10. Ensaio de liberação in vitro

O processo de liberação foi feito colocando 0,5 mL de amostra em tubos de diálise com permeabilidade a 14 KDa. Os tubos foram imersos em bequeres contendo 10 mL de solvente, incubados a 37°C sob agitação de 150 rpm (Figura 10) em um agitador orbital e devidamente fechados para evitar evaporação.

O solvente para os extratos não incorporados foi uma solução de PBS contendo 5% de DMSO e o solvente dos extratos incorporados foi somente o PBS. Em intervalo de tempo apropriados (0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48 e 72 horas) foram retirados 10 mL do solvente e armazenados em tubos de vidro sob refrigeração. O solvente foi substituído a cada amostragem. A absorbância foi monitorada por UV-Vis, usando como comprimento de onda de excitação em 350 nm, com a finalidade de comparar o período de liberação dos extratos puros com os incorporados.

Figura 10 - Aparato para a análise da liberação in vitro das amostras-teste



Fonte: Autor

Resultados

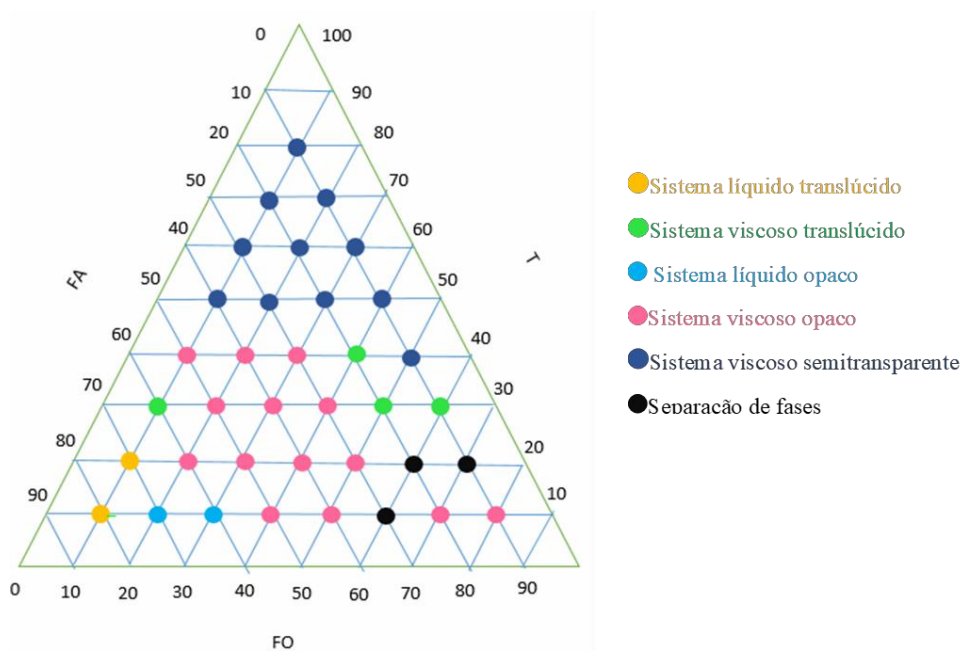
“As melhores e mais lindas coisas do mundo não se podem ver e nem tocar. Elas devem ser sentidas com o coração. Não devemos ter medo dos confrontos. Até os planetas se chocam, e do caos nascem as estrelas.” (Charles Chaplin)

4. RESULTADOS

4.1. Sistemas lipídicos nanoestruturados

O diagrama de fases (Figura 11) foi construído somente para SLN1, fixando-se a proporção de tensoativo e fase oleosa, e procedendo a titulação com a fase aquosa, obtendo, dessa maneira, 36 diferentes formulações. Com base nas análises das formulações construídas, 39% delas apresentaram como característica de sistema viscoso opaco, seguido de 31% como viscoso semitranslúcido, 11% como sistema viscoso translúcido, 8% com separação de fases e, por fim, sistema líquido translúcido e sistema líquido opaco com 6% cada.

Figura 11 - Classificação do diagrama de fases



O SLN2 foi preparado como deFigurascrito em Bonifácio et al. (2015).

Tanto no SLN1 como no SLN2, a formulação do ponto 1 constituída de 10% de fase oleosa, 10% de tensoativo e 80% de fase aquosa, foi selecionada para a incorporação dos extratos.

4.2 Caracterização dos sistemas lipídicos nanoestruturados

A Tabela 1 apresenta os valores das médias e os desvios-padrão dos diâmetros hidrodinâmicos, o IPD e PZ para as bases SLN1 e SLN2 e para os extratos incorporados.

De acordo com os resultados, podemos observar um aumento do diâmetro hidrodinâmico médio das gotículas após a incorporação dos extratos em comparação com as respectivas bases, sendo este estatisticamente diferente apenas para *B. holophylla*, o que representa um forte indício de que ocorreu efetivamente a incorporação. Este aumento somente não foi observado após a incorporação do extrato de *M. bella* em SLN2, indicando que a incorporação não provocou alterações significativas no diâmetro da gotícula do extrato de *M. bella* incorporado quando comparado com SLN2 (Tabela 1).

Além disso, os valores de IPD não variaram de maneira estatisticamente significativa entre as diferentes amostras (Tabela 1). O IPD mostra a homogeneidade relativa na população de gotículas distribuída na amostra medida. Quanto menor o IPD, maior a homogeneidade das amostras e valores abaixo que 0,5 indicam que estão homogêneos (GOYAL et al., 2012). Assim, as amostras dos extratos incorporados e das bases SLN1 e SLN2 apresentaram-se como esperado, ou seja, uniformes.

O PZ (mV) foi calculado através da observação da mobilidade eletroforética das gotículas submetidas a um campo elétrico. Os valores obtidos para os extratos incorporados não diferiram estatisticamente das bases (SLN1 e SLN2) (Tabela 1).

Todos esses parâmetros foram avaliados em um período de três meses com leituras quinzenais, a fim de acompanhar a estabilidade das amostras. Os resultados estão expostos na Figura 12 e mostraram que não houve diferenças estatisticamente significativas nas avaliações, demonstrando assim uma boa estabilidade dos sistemas desenvolvidos.

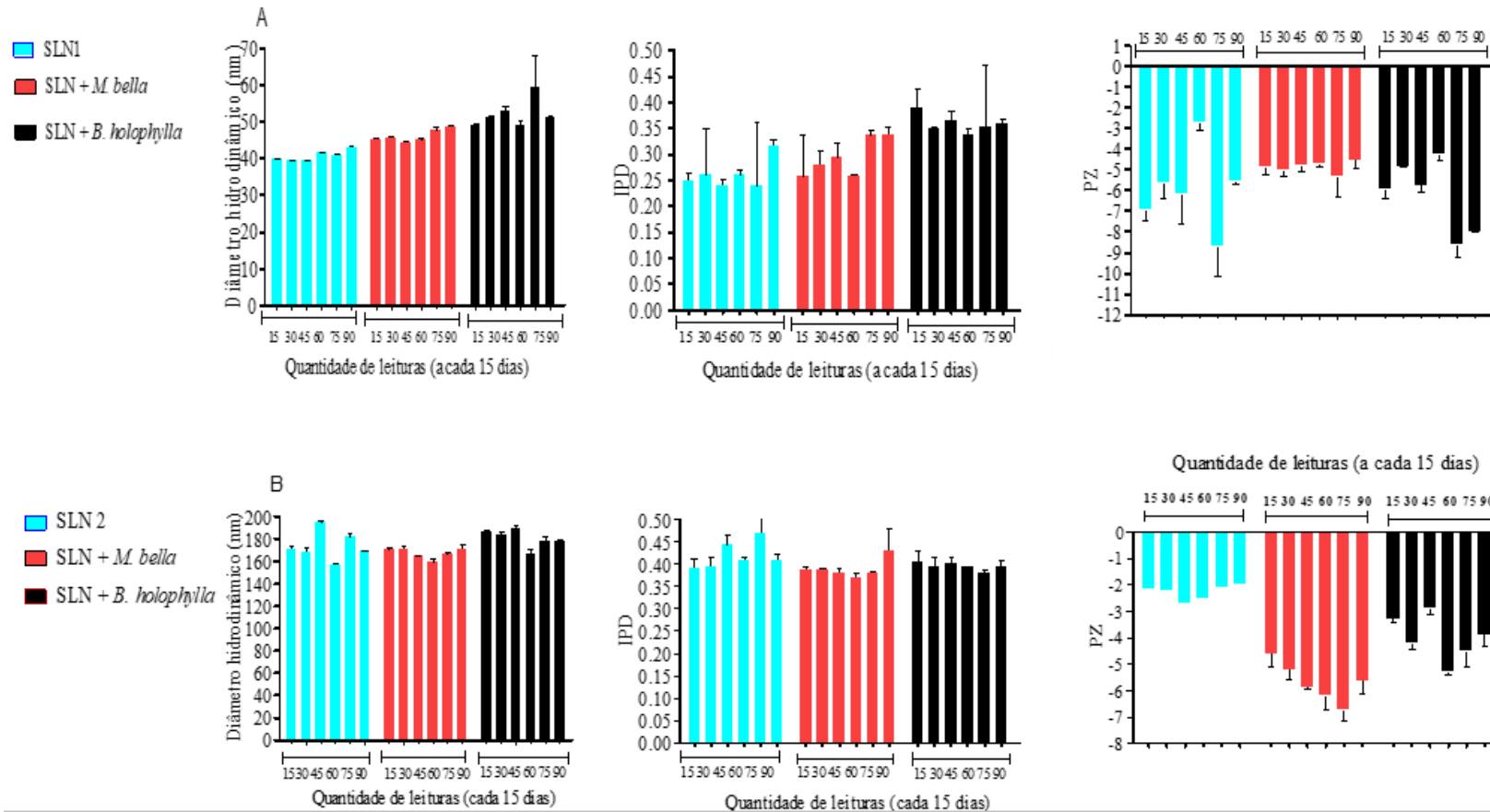
Tabela 1. Médias e desvios-padrão do diâmetro hidrodinâmico, do índice de polidispersidade (IPD) e potencial Zeta (PZ) para as bases com (SLN1) e sem (SLN2) o óleo de semente de uva, bem como dos extratos incorporados

Formulação	Diâmetro hidrodinâmico (nm)		IPD		PZ (mV)	
	SLN1	SLN2	SLN1	SLN2	SLN1	SLN2
SLN	42,7 ± 3,23	170,8 ± 2,18	0,224 ± 0,017	0,391 ± 0,021	- 6,345 ± 0,605	- 2,170 ± 0,135
SLN - <i>M. bella</i>	44,2 ± 0,70	170,2 ± 2,02	0,269 ± 0,012	0,388 ± 0,006	- 4,685 ± 0,175	- 4,600 ± 0,482
SLN - <i>B. holophylla</i>	54,1 ± 1,25*	186,9 ± 0,72*	0,363 ± 0,026	0,404 ± 0,026	- 5,680 ± 0,240	- 3,920 ± 0,226

SLN: sistema lipídico nanoestruturado; IPD: índice de polidispersidade; PZ: Potencial Zeta

*estatisticamente diferente da base do SLN

Figura 12 – Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersidade (IPD) e potencial Zeta (PZ) das bases SLN1 (A) e SLN2 (B), bem como dos extratos incorporados



SLN: sistema lipídico nanoestruturado; IPD: índice de polidispersidade; PZ: potencial Zeta

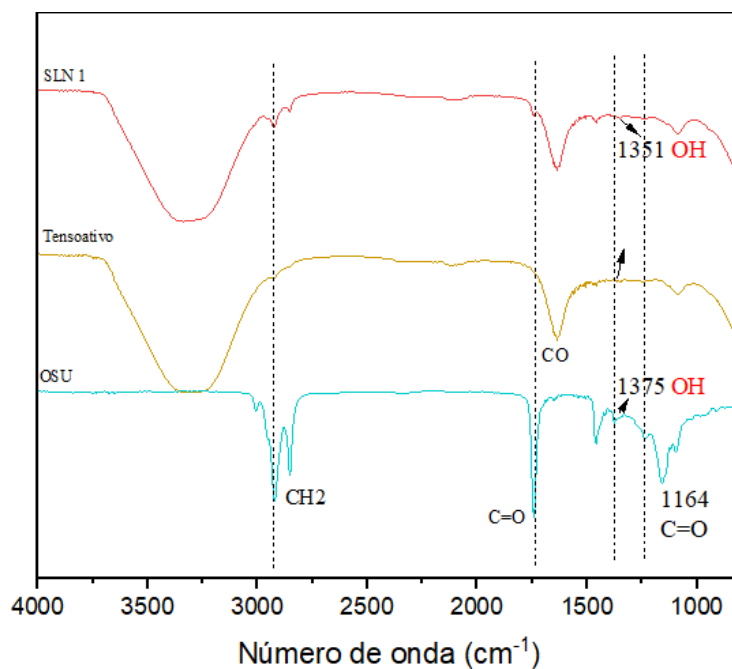
4.3. Espectroscopia de absorção no Infravermelho (FTIR)

Os espectros dos extratos incorporados, bases SLN1 e SLN2, bem como do OSU e tensoativo, obtidos por FTIR, estão apresentados nas Figuras 13 e 14.

O espectro do OSU indica a presença de grupamentos químicos CH_2 através da vibração dos picos na região de $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$, $\text{C}=\text{O}$ em 1750 e 1164 cm^{-1} e OH em 1375 cm^{-1} . Já o tensoativo apresentou um pico em 1636 referente à vibração do grupamento OH e um na região de 1096 referente a vibração da ligação C-O . A intensa banda na região de 3300 cm^{-1} pode corresponder à vibração do grupamento OH da água por representar o componente de maior quantidade (Figura 13).

O espectro de SLN1 é resultante da soma dos espectros do OSU e tensoativo, indicando picos somatórios, bem como deslocamentos de picos, o que sugere o indício de interação entre os componentes do sistema. Na base SLN1 é possível visualizar o pico na região de $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ referente aos grupamentos CH_2 do OSU e em 1636 cm^{-1} referente ao OH do tensoativo. No entanto, o pico referente ao OH do OSU foi deslocado da sua posição original de 1375 cm^{-1} para 1351 cm^{-1} , indicando a possibilidade de uma interação química fraca entre o óleo e o tensoativo, possivelmente através de ligação de hidrogênio. O pico em 1164 cm^{-1} do espectro do OSU não foi identificado no espectro do sistema, também indicativo de interação com os componentes do sistema (Figura 13).

Figura 13 – Espectros do óleo de semente de uva (OSU), tensoativo e base SLN1 obtidos pela técnica FTIR

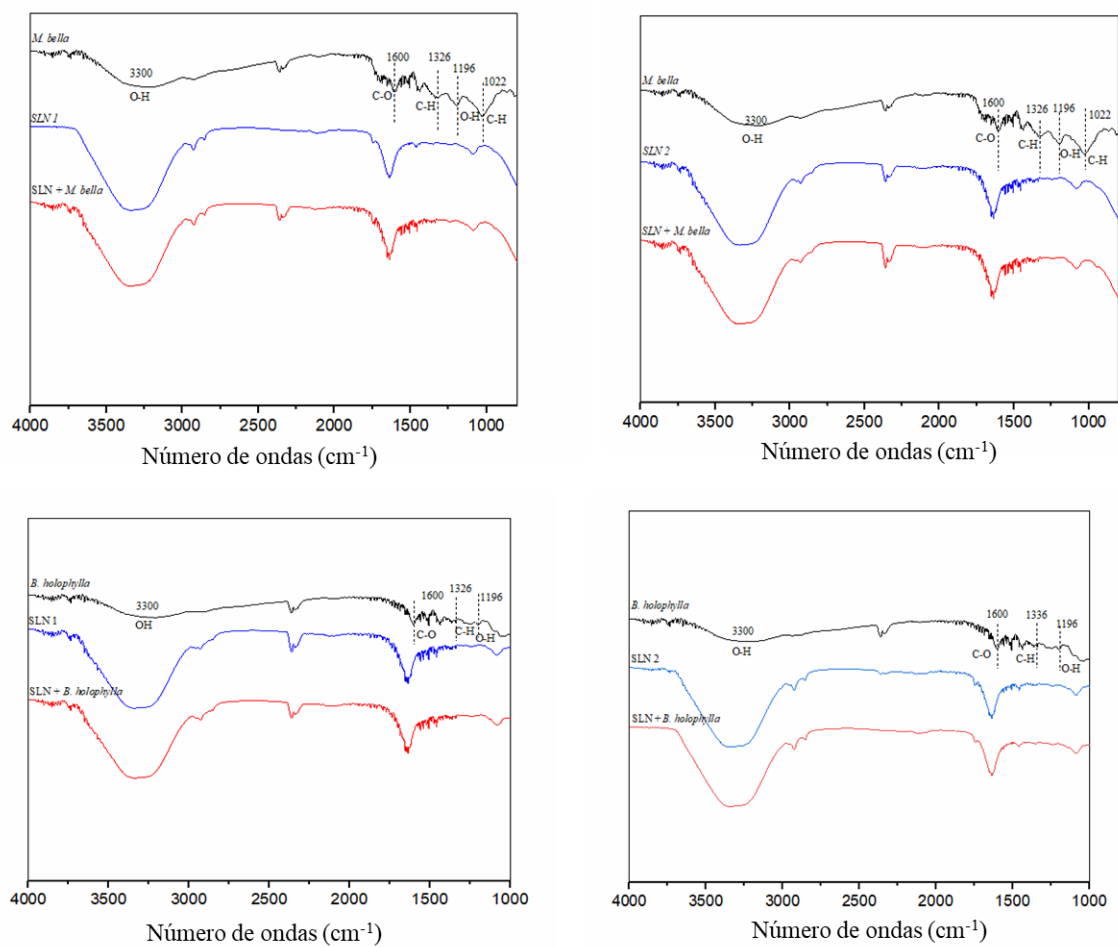


OSU: óleo de semente de uva; SLN1: sistema lipídico nanoestruturado com óleo de semente de uva

Como observado na Figura 14, os espectros de todas as amostras avaliadas apresentam grupamentos químicos CH₂, presentes no OSU e colesterol, que é indicado pela vibração dos picos na região de 2800-2900 cm^{-1} .

Comparando os extratos livres com os incorporados, tanto o espectro de *M. bella* quanto de *B. holophylla*, apresentaram bandas na região 1196 cm^{-1} correspondentes as vibrações de ligação C-H e OH apresentados nas estruturas aromáticas. Além disso, *M. bella* apresentou pico na região 1326 cm^{-1} correspondente a vibração de ligação do grupo C-H, enquanto que em *B. holophylla* a vibração correspondente a este grupo está na região 1336 cm^{-1} . Estas, são exemplos de bandas que não aparecem em nenhum dos sistemas, sugerindo a possibilidade de interação dos componentes dos extratos com os sistemas (Figura 14).

Figura 14 – Espectros dos extratos incorporados e não incorporados de *M. bella* e *B. holophylla*, bem como das bases SLN1 e SLN2 obtidos pela técnica FTIR



SLN1: sistema lipídico nanoestruturado com óleo de semente de uva; SLN2: sistema lipídico nanoestruturado sem óleo de semente de uva

4.4. Atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana dos extratos incorporados e não incorporados foi avaliada frente as cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Os valores de CIM estão apresentados na Tabela 2.

De uma maneira geral, os resultados obtidos mostraram que os extratos não incorporados foram mais eficazes que os incorporados.

Contra *E. coli*, ambos extratos EtOH70% das folhas *M. bella* e *B. holophylla* apresentaram CIM de 2000 µg/mL e quando incorporados tanto em SLN1 quanto em SLN2 não inibiram o crescimento bacteriano. De acordo com a avaliação da CBM, *B. holophylla* é bactericida e *M. bella* bacteriostática.

Com relação ao *S. aureus*, o extrato de *M. bella* também apresentou uma CIM de 2000 µg/mL, enquanto que a de *B. holophylla* foi de 500 µg/mL. Quando incorporados, o extrato de *M. bella* manteve a CIM de 2000 µg/mL apenas no SLN1 e *B. holophylla* não apresentou qualquer atividade. O extrato não incorporado de *B. holophylla* e o incorporado de *M. bella* foram considerados bacteriostáticos, e o não incorporado de *M. bella* bactericida.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos incorporados e não incorporados de *M. bella* e *B. holophylla* frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus*

CIM*/CBM*				
Amostras/cepas	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
DMSO 20%	-		-	
<i>M. bella</i>	2000/ BC 2000		2000/ BT > 2000	
<i>B. holophylla</i>	500/ BT >2000		2000/ BC 1000	
Ampicilina	0,04		2,5	
	SLN1	SLN2	SLN1	SLN2
SLN	-	-	-	-
SLN- <i>M. bella</i>	2000/ BT >2000	>2000	>2000	>2000
SLN- <i>B. holophylla</i>	>2000	>2000	>2000	>2000

* µg/mL; CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Concentração bactericida mínima; SLN: sistema lipídico nanoestruturado; BC: bactericida; BT: bacteriostático; (-): sem inibição; SLN1: sistema lipídico nanoestruturado com óleo de semente de uva; SLN2: sistema lipídico nanoestruturado sem óleo de semente de uva.

A Tabela 3 apresenta os valores de CIM observados por meio da avaliação da atividade antifúngica dos extratos incorporados e não incorporados. Os extratos foram avaliados frente as leveduras: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

De acordo com os resultados obtidos, os extratos apresentaram atividade antifúngica frente a todas as cepas testadas, sendo que *M. bella* teve uma melhor ação que *B. holophylla* com relação ao extrato livre.

O extrato não incorporado de *M. bella* apresentou CIM de 3,9 µg/mL para *C. glabrata*, 7,8 µg/mL para *C. krusei*, 15,6 µg/mL para *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* e 31,25 µg/mL para *C. albicans*. Quando incorporado no SLN1, apresentou CIM de 1,95 µg/mL para *C. glabrata*, manteve a CIM de 7,8 µg/mL para *C. krusei* e 15,6 µg/mL para *C. tropicalis* e 31,25 µg/mL para *C. albicans* e *C. parapsilosis*. No SLN2, as CIMs foram de 3,9 µg/mL para *C. glabrata*, 7,8 µg/mL para *C. krusei* e *C. tropicalis*, 15,6 µg/mL para *C. parapsilosis* e 31,25 µg/mL para *C. albicans*. O extrato apresentou

caráter fungistático ($>125 \mu\text{g/mL}$) frente a todas as cepas, livre e incorporado, exceto contra *C. tropicalis*, que foi identificado como fungicida em $61,25 \mu\text{g/mL}$ quando incorporado em SLN1.

Com relação a espécie vegetal *B. holophylla*, o extrato não incorporado apresentou CIM de $15,6 \mu\text{g/mL}$ para *C. glabrata*, $62,5 \mu\text{g/mL}$ para *C. krusei* e *C. tropicalis* e $125 \mu\text{g/mL}$ para *C. albicans* e *C. parapsilosis*, com perfil fungistático contra todas as cepas ($> 125 \mu\text{g/mL}$), exceto para contra a *C. tropicalis* que foi fungicida na concentração de $125 \mu\text{g/mL}$. Quando incorporado em SLN1, os valores de CIM foram maiores frente as cepas, sendo de $250 \mu\text{g/mL}$ para *C. glabrata*, $125 \mu\text{g/mL}$ para *C. krusei* e *C. tropicalis* e $1000 \mu\text{g/mL}$ para *C. albicans*, com ação fungicida contra a *C. krusei* e *C. tropicalis* na concentração de $500 \mu\text{g/mL}$. O extrato incorporado de *B. holophylla* em SLN1 não inibiu o crescimento da levedura *C. parapsilosis*. No SLN2, as CIMs foram de $31,25 \mu\text{g/mL}$ para *C. glabrata* e $250 \mu\text{g/mL}$ para *C. krusei* e *C. tropicalis*, com característica fungicida apenas para *C. krusei* ($250 \mu\text{g/mL}$). Para *C. albicans* e *C. parapsilosis* não foi observada a ação antifúngica.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos incorporados e não incorporados de *M. bella* e *B. holophylla* frente a diferentes espécies de *Candida*

Amostras/cepas	CIM*/CFM*									
	<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. albicans</i>	
	SLN1	SLN2	SLN1	SLN2	SLN1	SLN2	SLN1	SLN2	SLN1	SLN2
DMSO 20%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. bella</i>	3,9/ FT >125	3,9/ FT >125	7,8/ FT >125	7,8/ FT >125	15,6/ FT >125	15,6/ FT >125	15,6/ FT >125	7,8/ FT >125	31,25/ FT >125	31,25/ FT >125
<i>B. holophylla</i>	15,6/ FT >125	15,6/ FT >125	62,5/ FT >125	62,5/ FT >125	125/ FT >125	125/ FT >125	62,5/ FC 125	62,5/ FC 125	125/ FT >125	125/ FT >125
Anfotericina B	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	0,25	0,05	0,05	0,25	0,25
Fluconazol	R	R	15,81	15,81	7,9	7,9	63,25	63,25	R	R
SLN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SLN - <i>M. bella</i>	1,95/ FT >125	3,9/ FT >125	7,8/ FT >125	7,8/ FT >125	31,25/ FT >125	15,6/ FT >125	15,6/ FC 61,25	7,8/ FT >125	31,25/ FT >125	31,25/ FT >125
SLN- <i>B. holophylla</i>	250/ FT >1000	31,25 FT >1000	125/ FC 500	250/ FC 250	>1000	>1000	125/ FC 500	250/ FT >1000	1000/ FT >1000	>1000

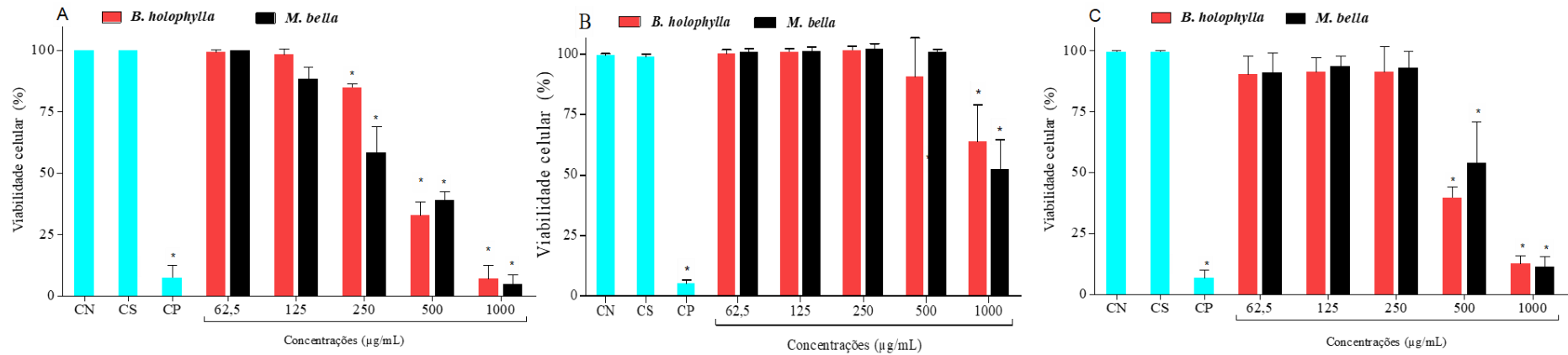
* µg/mL; CIM: Concentração inibitória mínima; CFM: Concentração fungicida mínima; SLN: sistema lipídico nanoestruturado; FC: fungicida; FT: fungistático; R: resistente; (-): sem inibição SLN1: sistema lipídico nanoestruturado com óleo de semente de uva; SLN2: sistema lipídico nanoestruturado sem óleo de semente de uva.

4.5. Citotoxicidade

Os extratos não incorporados e incorporados foram avaliados quanto ao seu potencial citotóxico frente as linhagens celulares humanas GM-07492, HepG2 e HeLa por meio de ensaio de viabilidade celular da resazurina (*Alamar blue*), que indica o status do perfil metabólico celular.

De acordo com os resultados obtidos, os extratos de *M. bella* e *B. holophylla* apresentaram um potencial citotóxico semelhante. Foi possível observar que ambos induziram uma redução estatisticamente significativa na viabilidade celular de GM-07492 nas concentrações de 1000, 500 e 250 µg/mL, em HepG2 apenas na maior concentração testada (1000 µg/mL), e frente as células HeLa, o efeito citotóxico foi observado nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL (Figura 15).

Figura 15 - Ensaio de viabilidade celular com as linhagens GM-07492 (A), HepG2 (B), HeLA (C) tratadas com os extratos de *M. bella* e *B. holophylla*



Os valores são apresentados como média e desvio-padrão. CN: Controle negativo (meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, viabilidade celular de 100%); CS: controle solvente (1% DMSO, máxima concentração de solvente utilizada no teste, viabilidade celular de 100%) CP: controle positivo (DMSO 20%; viabilidade celular de 7,45% em GM 04792, 4,64% em HepG2 e 6,59% em HeLa).

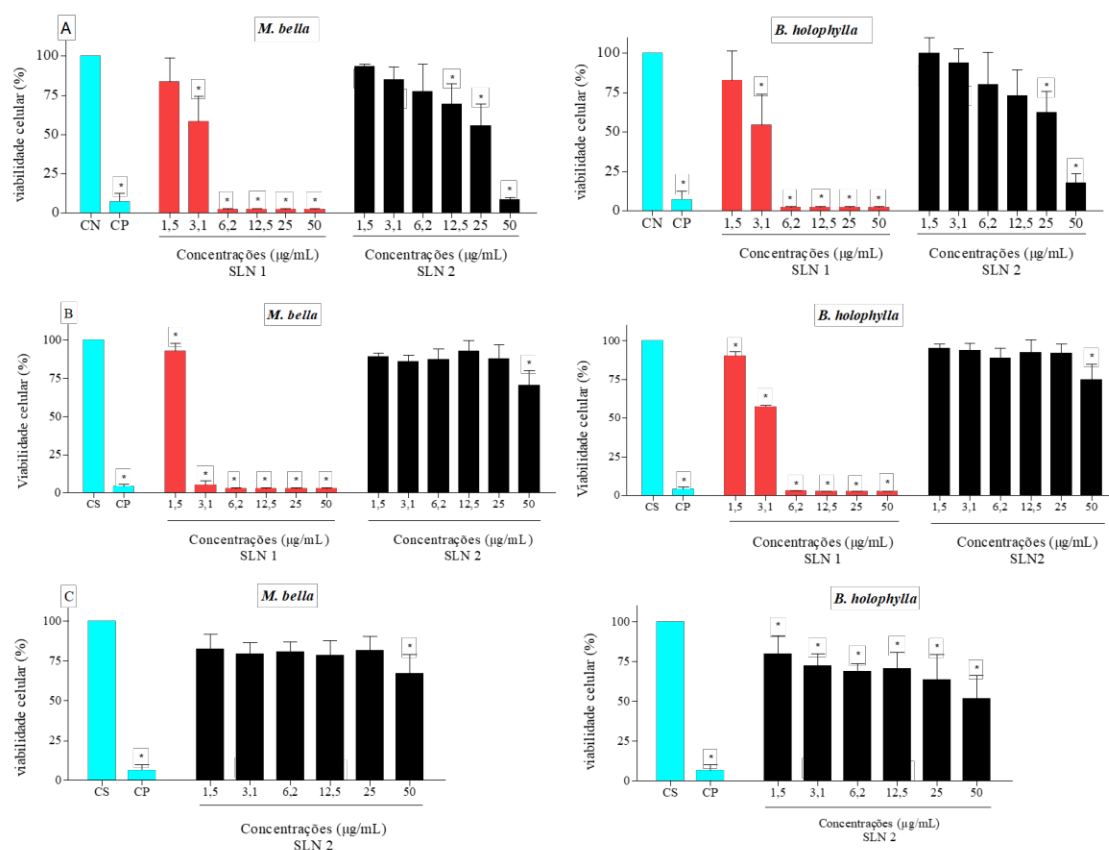
*Significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

A incorporação em ambos sistemas provocou uma alta toxicidade. Por isso, tornou-se necessário diminuir as concentrações.

Tanto o extrato de *M. bella* como de *B. holophylla* incorporados em SLN1 reduziram estatisticamente a viabilidade celular de GM-07492 e HepG2 em todas as concentrações testadas comparadas ao controle negativo, exceto na menor concentração (1,5 µg/mL) frente a GM-07492, que induziu uma redução após os tratamentos com ambos extratos, mas essa não foi estatisticamente significativa. Os extratos incorporados em SLN1 não foram testados frente a linhagem celular HeLa.

Este perfil citotóxico foi alterado quando incorporados na base do SLN2. Com relação a GM-07492, *M. bella* incorporada mostrou-se mais citotóxica que *B. holophylla*, reduzindo estatisticamente a viabilidade celular nas três maiores concentrações (12,5, 25 e 50 µg/mL), enquanto que *B. holophylla* reduziu somente nas concentrações de 25 e 50 µg/mL. Frente a HepG2, ambos foram capazes de diminuir, de maneira estatisticamente significativa, a viabilidade celular apenas na maior concentração testada (50 µg/mL). E por fim, com relação as células HeLa, *M. bella* induziu citotoxicidade apenas com 50 µg/mL, enquanto que o extrato de *B. holophylla* incorporado foi citotóxico em todas as concentrações testadas (Figura 16).

Figura 16 - Ensaio de viabilidade celular com as linhagens GM-07492 (A), HepG2 (B) e HeLa (C) tratadas com os extratos incorporados de *M. bella* e *B. holophylla* nos sistemas lipídicos nanoestruturados contendo (SLN1) ou não (SLN2) óleo de semente de uva



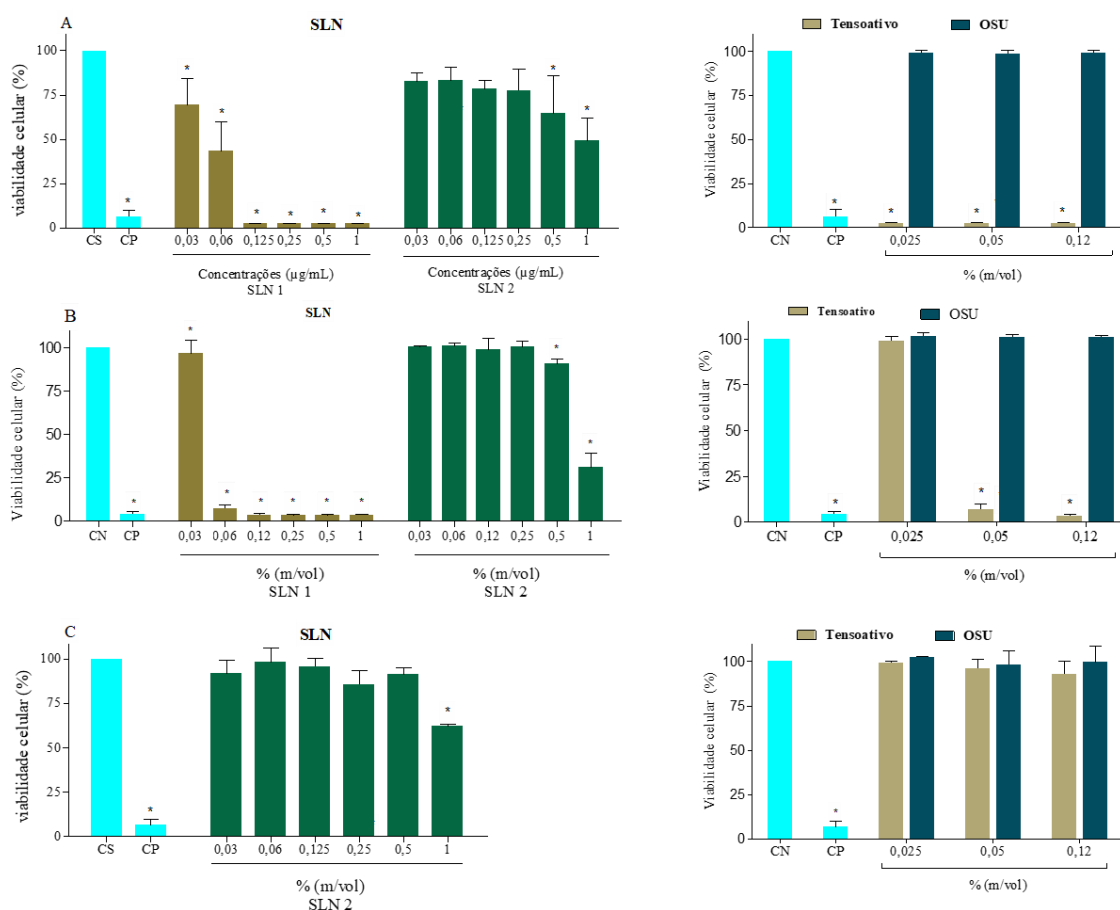
Os valores são apresentados como média e desvio-padrão. CN: controle negativo (meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, viabilidade celular de 100%); CP: controle positivo (DMSO 20%; viabilidade celular de 7,45% em GM 04792, 4,64% em HepG2 e 6,59% em HeLa).

*Significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

Frente aos resultados descritos acima, SLN1, SLN2, o OSU isolado e o tensoativo foram avaliados. As concentrações foram determinadas pela porcentagem de massa por volume do poço (% m/vol). Os resultados mostraram o potencial citotóxico de todas as concentrações da base SLN1 frente a GM-07492 e HepG2 (Figura 17). SLN1 não foi testado nas células HeLa.

Já com relação a SLN2, a ação citotóxica foi observada nas concentrações de 1 e 0,5% m/vol frente a GM-07492 e HepG2 e apenas em 1% m/vol para HeLa. Entretanto, o óleo sozinho não induziu qualquer efeito citotóxico nas linhagens, diferente do tensoativo que reduziu estatisticamente a viabilidade de GM-07492 em todas as concentrações e de HepG2 nas concentrações de 0,12 e 0,05% m/vol. O tensoativo não induziu qualquer efeito citotóxico nas células HeLa (Figura 17).

Figura 17 - Ensaio de viabilidade celular com as linhagens GM-07492 (A), HepG2 (B) e HeLa (C) tratadas com as bases dos sistemas lipídicos nanoestruturados contendo (SLN1) ou não (SLN2) óleo de semente de uva, além do óleo de semente de uva e tensoativo isoladamente



Os valores são apresentados como média e desvio-padrão. CN: controle negativo (meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, viabilidade celular de 100%); CP: controle positivo (DMSO 20%; viabilidade celular de 7,45% em GM 04792, 4,64% em HepG2 e 6,59% em HeLa).

*Significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

Para facilitar a comparação entre os resultados obtidos, foi calculado o EC_{50} (concentração efetiva que mata 50% das células viáveis) das diferentes amostras. A determinação do EC_{50} foi realizada pela obtenção de duas variâncias pela equação $y=ax+b$. Os dados são mostrados na Tabela 4.

Os resultados mostraram que a linhagem celular normal GM-07492 foi mais sensível aos efeitos tóxicos dos extratos, seguido da linhagem HeLa e por fim HepG2.

Os extratos incorporados em SLN1 foram evidentemente mais citotóxicos do que em SLN2. Ambos quando incorporados, tiveram maior potencial citotóxico nas

células HepG2 do que em GM-07492. No entanto, quando em SLN2 apresentaram maior citotoxicidade em GM-07492, seguido de HepG2 e HeLa, exceto *B. holophylla* que foi mais citotóxica em HeLa do que em HepG2.

Tabela 4 - EC₅₀ dos extratos incorporados de *M. bella* e *B. holophylla* nos sistemas lipídicos nanoestruturados contendo (SLN1) ou não (SLN2) óleo de semente de uva

	EC ₅₀ (µg/mL)					
	GM-07492		HepG2		HeLa	
Amostras						
<i>M. bella</i>	327		2050		557	
<i>B. holophylla</i>	473		1151		486	
	SLN1	SLN2	SLN1	SLN2	SLN1	SLN2
SLN - <i>M. bella</i>	5,45	23,8	1,38	84,08	-	381,4
SLN - <i>B. holophylla</i>	3,0	34,5	2,71	121,4	-	61,7

SLN: sistema lipídico nanoestruturado; (-): não testado; SLN1: sistema lipídico nanoestruturado com óleo de semente de uva; SLN2: sistema lipídico nanoestruturado sem óleo de semente de uva.

4.6. Mutagenicidade

As Tabelas 5 e 6 mostram a média do número de revertentes/ placa (M), o desvio padrão (DP) e o índice de mutagenicidade (IM) após os tratamentos com os extratos incorporados de *M. bella* e *B. holophylla* respectivamente, bem como das bases SLN1 e SLN2, OSU e tensoativo (T) observados em linhagens TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*, na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que *M. bella* tanto em SLN1 quanto em SLN2 não apresentou atividade mutagênica em nenhuma das concentrações testadas, tanto na presença (+S9) quanto na ausência de metabolização (-S9). Indícios de mutagenicidade foram observados na linhagem TA100 nos experimentos com ativação metabólica e TA102 sem ativação metabólica no tratamento de *M. bella* em SLN2 (Tabela 5).

Com relação a *B. holophylla*, a incorporação em SLN2 não inibiu a mutagenicidade previamente observada do extrato livre (anexo 2), na linhagem TA98 nos ensaios com S9. Além disso, indícios de mutagenicidade foram observados na linhagem TA100 nos testes com metabolização de *B. holophylla* incorporada em SLN2 (Tabela 6).

As linhagens TA100 e TA102 foram mais sensíveis aos efeitos tóxicos dos extratos incorporados, por isso foi necessário diminuir as concentrações (Tabelas 5 e 6).

O IM da base SLN1 foi menor do que o observado após o tratamento com SLN2, indicando maior toxicidade nas cepas de *S. typhimurium* testadas.

O OSU não induziu qualquer aumento estatisticamente significativo no número de colônias revertentes comparado ao controle espontâneo, demonstrando ausência de mutagenicidade nas condições utilizadas. Por outro lado, o tensoativo quando testado isoladamente, foi mutagênico nas linhagens TA100 (com e sem S9) e TA102 (sem S9). Na linhagem TA98 (com e sem S9) e TA102 (com S9) inibiu completamente o crescimento bacteriano.

Tabela 5 - Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* após o tratamento com o extrato incorporado de *M. bella*, bem como das bases SLN1 e SLN2, OSU e tensoativo (T)

Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM							
TA 98			TA 100			TA 102	
Tratamentos	- S9	+ S9	Tratamentos	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CE	35 ± 3	42 ± 7	CE	141 ± 8	117 ± 18	249 ± 44	275 ± 39
C +	756 ± 24***a	871 ± 39***d	C +	1888 ± 102***b	1589 ± 86***d	2661 ± 147***c	1510 ± 114***e
SLN1	32 ± 3 (0,91)	40 ± 3 (0,95)	SLN1	115 ± 8 (0,81)	129 ± 11 (1,10)	174 ± 23 (0,70)	225 ± 29 (0,82)
OSU	34 ± 5 (0,96)	46 ± 1 (1,10)	OSU	172 ± 17 (1,22)	141 ± 28 (1,21)	299 ± 42 (1,20)	389 ± 33 (1,42)
T	Tóxico	Tóxico	T	534 ± 35** (3,79)	602 ± 57** (5,17)	1887 ± 102** (7,58)	Tóxico
SLN1 + MB mg/placa		SLN1 + MB mg/placa					
0,62	31 ± 1 (0,89)	43 ± 1 (1,02)	0,31	118 ± 21 (0,83)	141 ± 11 (1,21)	289 ± 16 (1,16)	269 ± 25 (0,98)
1,25	38 ± 2 (1,07)	41 ± 6 (0,98)	0,62	120 ± 15 (0,85)	154 ± 28 (1,32)	218 ± 23 (0,87)	246 ± 12 (0,90)
2,50	34 ± 3 (0,97)	41 ± 3 (0,98)	1,25	136 ± 31 (0,96)	146 ± 16 (1,25)	220 ± 34 (0,88)	229 ± 21 (0,83)
3,75	37 ± 3 (1,06)	38 ± 3 (0,90)	1,87	142 ± 17 (1,01)	128 ± 18 (1,09)	223 ± 12 (0,90)	175 ± 13 (0,64)
5,00	35 ± 2 (0,99)	37 ± 8 (0,87)	2,50	126 ± 14 (0,89)	134 ± 16 (1,15)	247 ± 18 (0,99)	88 ± 10 (0,32)
SLN2	48 ± 1 (1,37)	41 ± 1 (0,98)	SLN2	147 ± 11 (1,04)	139 ± 27 (1,19)	358 ± 30 (1,44)	378 ± 41 (1,38)
SLN2 + MB mg/placa		SLN2 + MB mg/placa					
0,62	38 ± 2 (1,07)	47 ± 9 (1,11)	0,31	158 ± 14 (1,12)	152 ± 13 (1,30)	350 ± 21 (1,40)	401 ± 30 (1,46)
1,25	33 ± 2 (0,93)	46 ± 6 (1,10)	0,62	167 ± 18 (1,18)	167 ± 24 (1,43)	310 ± 26 (1,24)	386 ± 26 (1,40)
2,50	37 ± 4 (1,04)	54 ± 4 (1,27)	1,25	124 ± 20 (0,88)	210 ± 11* (1,80)	305 ± 39 (1,22)	344 ± 17 (1,25)
3,75	45 ± 6 (1,27)	52 ± 8 (1,24)	1,87	115 ± 11 (0,81)	185 ± 35* (1,59)	305 ± 30 (1,22)	374 ± 31 (1,36)
5,00	45 ± 6 (1,27)	60 ± 6 (1,43)	2,50	114 ± 16 (0,80)	185 ± 14* (1,58)	389 ± 14* (1,56)	347 ± 33 (1,26)

*P < 0,05 (ANOVA); **P < 0,01 (ANOVA), M ± DP = média e desvio padrão; CE: controle espontâneo; MB: *Myrcia bella*; SLN1: sistema lipídico nanoestruturado com óleo de semente de uva (100 µL/ placa); SLN2: sistema lipídico nanoestruturado sem óleo de semente de uva (100 µL/ placa); OSU: óleo de semente de uva (2,4 µL/ placa); T: tensoativo (2,4 µL/ placa); C+: Controle positivo - ^a4-nitro-*o*-fenilenodiamino (10,0 µg/ placa – TA98); ^bAzida Sódica (1,25 µg/placa – TA100); ^cMitomicina C (0,5 µg/ placa – TA102), em ausência de S9 e ^d2-aminoantraceno (1,25 µg/ placa – TA98, TA100); ^e2-aminofluoreno (10 µg/ placa – TA102), na presença de S9.

Tabela 6 - Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* após o tratamento com o extrato incorporado de *B. holophylla*, bem como das bases SLN1 e SLN2, OSU e tensoativo (T)

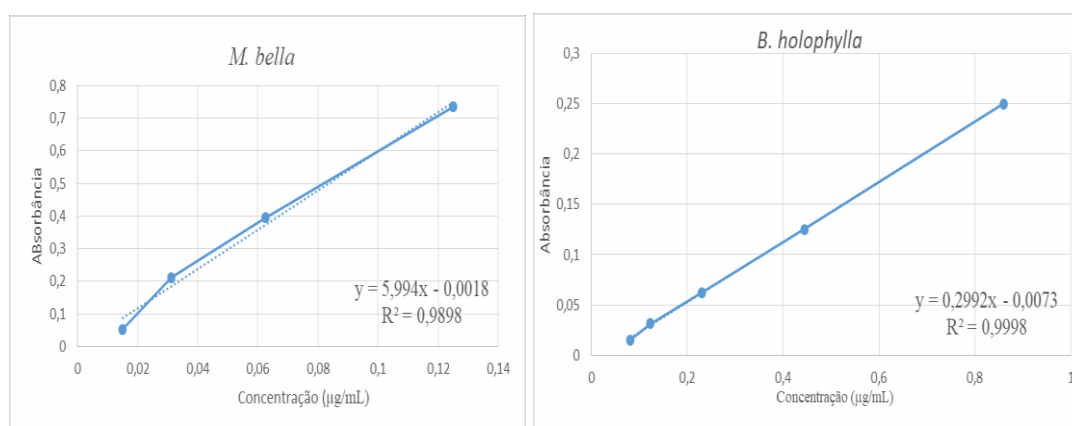
Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM								
TA 98			TA 100			TA 102		
Tratamentos	- S9	+ S9	Tratamentos	- S9	+ S9	- S9	+ S9	
CE	35 ± 3	42 ± 7	CE	141 ± 8	117 ± 18	249 ± 44	275 ± 39	
C +	756 ± 24***a	871 ± 39***d	C +	1888 ± 102***b	1589 ± 86***d	2661 ± 147***c	1510 ± 114***e	
SLN1	32 ± 3 (0,91)	40 ± 3 (0,95)	SLN1	115 ± 8 (0,81)	129 ± 11 (1,10)	174 ± 23 (0,70)	225 ± 29 (0,82)	
OSU	34 ± 5 (0,96)	46 ± 1 (1,10)	OSU	172 ± 17 (1,22)	141 ± 28 (1,21)	299 ± 42 (1,20)	389 ± 33 (1,42)	
T	Tóxico	Tóxico	T	534 ± 35** (3,79)	602 ± 57** (5,17)	1887 ± 102** (7,58)	Tóxico	
SLN1 + BH mg/placa			SLN1 + BH mg/placa					
0,62	31 ± 3 (0,89)	41 ± 4 (0,96)	0,31	160 ± 19 (1,13)	168 ± 10 (1,44)	261 ± 47 (1,05)	290 ± 14 (1,06)	
1,25	33 ± 2 (0,93)	36 ± 3 (0,86)	0,62	167 ± 27 (1,18)	135 ± 21 (1,15)	197 ± 31 (0,79)	245 ± 31 (0,89)	
2,50	30 ± 4 (0,84)	41 ± 1 (0,98)	1,25	129 ± 25 (0,91)	141 ± 15 (1,21)	223 ± 28 (0,90)	241 ± 23 (0,88)	
3,75	36 ± 6 (1,01)	40 ± 7 (0,95)	1,87	153 ± 13 (1,09)	137 ± 12 (1,18)	220 ± 14 (0,88)	220 ± 25 (0,80)	
5,00	35 ± 1 (1,00)	35 ± 1 (0,83)	2,50	144 ± 24 (1,02)	130 ± 20 (1,12)	267 ± 25 (1,07)	265 ± 11 (0,97)	
SLN2	48 ± 1 (1,37)	41 ± 1 (0,98)	SLN2	147 ± 11 (1,04)	139 ± 27 (1,19)	358 ± 30 (1,44)	378 ± 41 (1,38)	
SLN2 + BH mg/placa			SLN2 + BH mg/placa					
0,62	32 ± 4 (0,90)	66 ± 8* (1,57)	0,31	138 ± 33 (0,98)	180 ± 13* (1,55)	344 ± 23 (1,38)	403 ± 45 (1,47)	
1,25	30 ± 3 (0,86)	80 ± 21* (1,89)	0,62	147 ± 21 (1,04)	166 ± 24 (1,42)	338 ± 14 (1,36)	362 ± 23 (1,32)	
2,50	36 ± 1 (1,03)	100 ± 11** (2,38)	1,25	160 ± 18 (1,13)	160 ± 11 (1,37)	296 ± 29 (1,19)	411 ± 13 (1,50)	
3,75	32 ± 6 (0,91)	124 ± 23** (2,95)	1,87	150 ± 14 (1,06)	189 ± 35* (1,62)	298 ± 31 (1,19)	337 ± 28 (1,23)	
5,00	32 ± 1 (0,90)	156 ± 26** (3,71)	2,50	179 ± 21 (1,27)	152 ± 14 (1,30)	321 ± 12 (1,29)	339 ± 35 (1,23)	

*P < 0,05 (ANOVA); **P < 0,01 (ANOVA), M ± DP = média e desvio padrão; CE: controle espontâneo; BH: *B. holophylla*; SLN1: sistema lipídico nanoestruturado com óleo de semente de uva (100 µL/ placa); SLN2: sistema lipídico nanoestruturado sem óleo de semente de uva (100 µL/ placa); OSU: óleo de semente de uva (2,4 µL/ placa); T: tensoativo (2,4 µL/ placa); C+: Controle positivo - ^a4-nitro-*o*-fenilenodiamino (10,0 µg/ placa – TA98); ^bAzida Sódica (1,25 µg/placa – TA100); ^cMitomicina C (0,5 µg/ placa – TA102), em ausência de S9 e ^d2-aminoantraceno (1,25 µg/ placa – TA98, TA100); ^e2-aminofluoreno (10 µg/ placa – TA102), na presença de S9.

4.7. Ensaio de liberação

As concentrações dos extratos de *M. bella* e *B. holophylla* liberadas neste ensaio foram determinadas através de uma curva analítica (curva da absorbância das amostras em função das concentrações) (Figura 18).

Figura 18 - Curva padrão obtida no ensaio de liberação in vitro dos extratos de *M. bella* e *B. holophylla*



Durante o experimento de liberação, alíquotas das amostras foram retiradas nos tempos 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48 e 72 horas. De acordo com os resultados apresentados na Figura 19, pode-se observar uma maior taxa de liberação nas primeiras 8 horas de ensaio para todas amostras avaliadas.

A porcentagem de liberação foi maior para os extratos livres, em todos os tempos de coleta, comparados às formulações. O extrato de *M. bella* se estabilizou após 24 horas, com aproximadamente 47% de liberação, chegando a 50% em 48 horas, enquanto que o extrato de *B. holophylla* se estabilizou com cerca de 70% de liberação no tempo de 48 horas.

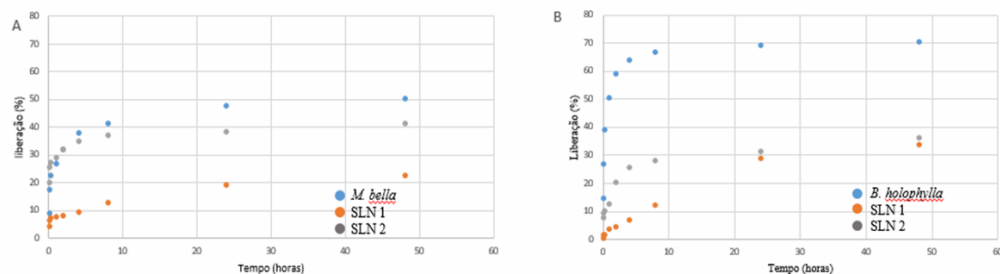
O extrato de *M. bella* incorporado em SLN1 teve sua liberação estabilizada após 24 horas com cerca de 18% de componentes liberados, chegando a 22% em 48 horas. Quando incorporado em SLN2 o sistema possibilitou o dobro de liberação, com 38% em 24 horas, estabilizando-se com 41% em 48 horas.

Como *M. bella*, o extrato de *B. holophylla* incorporado em SLN1 teve a princípio sua liberação estabilizada após 24 horas com cerca de 29% de componentes

liberados, no entanto chegou a 33% em 48 horas. Já quando incorporado em SLN2 obteve uma liberação estabilizada com 31% em 24 horas, chegando a 36% em 48 horas.

De uma maneira geral, os SLNs desenvolvidos levaram à diminuição da liberação dos extratos. Este fato está de acordo com os resultados de FTIR, os quais indicam a possibilidade de interação dos extratos com os componentes dos sistemas, justificando a diminuição da liberação.

Figura 19 - Ensaio de liberação in vitro dos extratos livres e incorporados de *M. bella* (A) e *B. holophylla* (B) nos sistemas lipídicos nanoestruturados contendo (SLN1) ou não (SLN2) óleo de semente de uva



Discussão

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi avaliado a atividade antimicrobiana dos extratos EtOH70% de *M. bella* e *B. holophylla* puros e associados a nanotecnologia, que apresenta uma resposta potencial à resistência antimicrobiana e estimula a inovação de promissoras formas de tratamentos (KUMAR et al., 2018). Além disso, para garantir a segurança do uso das diferentes amostras foi também investigado o potencial citotóxico e mutagênico.

As propriedades das microemulsões, como a maior solubilidade do fármaco, a proteção contra a hidrólise enzimática, a facilidade de fabricação e a capacidade de melhorar a permeação são muitas vezes superiores às formulações convencionais e vem sendo exploradas na indústria farmacêutica, desempenhando um papel importante nos sistemas de liberação de fármacos. No entanto, a aplicação se torna restrita dependendo da sua viscosidade (FENG et al., 2009). Pensando em superar este inconveniente, no presente estudo foram preparados dois SLNs, um com (SLN1) e o outro sem (SLN2) o OSU. O óleo proporcionou um sistema mais aquoso e transparente, enquanto que sem óleo, a base ficou opaca e viscosa. Óleos vegetais, como de milho, de algodão, de laranja, triglicerídeos e ésteres de ácidos graxos (miristato de isopropila, oleato de etila, etc) são frequentemente utilizados como componentes oleosos, na intenção de desenvolver “microemulsões biocompatíveis” (GUPTA e MOULIK, 2007).

A formulação mais viscosa (SLN2) tornou-se interessante frente aos promissores resultados obtidos após os tratamentos contra as diferentes espécies de *Candida*, pois devido a esta característica, pode permitir maior adesividade em mucosas.

Como tensoativo foi utilizado uma mistura de polioxietileno 20 cetil éter (Brij 58) e fosfatidilcolina de soja. O polioxietileno 20 cetil éter (Brij 58) é um tensoativo não iônico com equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico (OLIVEIRA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002); tensoativos não iônicos oferecem uma considerável vantagem de não precisarem de um cotensoativo para a formação de microemulsões (LAWRENCE, 1996). Além disso, o Brij 58 torna possível uma interação com a membrana celular e melhora a liberação de drogas dentro das células (BONIFÁCIO et al, 2015), que associado aos fosfolipídios apresentam um particular interesse na preparação de microemulsões, devido o bicompartimento natural destes últimos (ABOOFAZELI et al., 1994; SHINODA et al., 1991).

Ao analisar a caracterização estrutural das microemulsões desenvolvidas, os resultados sugerem uma microemulsão óleo em água, ou seja, gotículas de óleo em água, estabilizadas por uma película interfacial de surfactantes.

Pode-se observar um aumento do diâmetro hidrodinâmico médio após a incorporação dos extratos em ambas as formulações, exceto a incorporação do extrato de *M. bella* em SLN2. Este aumento é um forte indício de que ocorreu efetivamente a incorporação. Os valores variaram entre $42,7 \pm 3,23$ e $186,9 \pm 0,72$, dentro da faixa de 10-250 nm (100-2500 Å), intervalo ideal para SLN do tipo microemulsão segundo Formariz et al., 2005.

No que diz respeito ao IPD, observa-se que os valores tanto das bases quanto das formulações contendo os extratos variaram entre $0,224 \pm 0,017$ e $0,404 \pm 0,026$, o que permite inferir que as amostras são homogêneas. Além disso, SLN1 e os extratos incorporados são mais homogêneos do que as amostras em SLN2, uma vez que os valores são menores quando comparados (MOGHIMIPOUR, SÃLIMI e EFTEKHARI, 2013).

Sobre o PZ, este está diretamente envolvido na estabilidade física das gotículas podendo passar por modificações que possam ocorrer na interface com o meio disperso, ou seja, na dissociação de grupos funcionais na superfície da gotícula ou na adsorção de possíveis espécies iônicas presentes no meio aquoso (OBEIDAT et al., 2010). Os valores obtidos para os extratos incorporados não diferiram estatisticamente das bases (SLN1 e SLN2). O valor negativo observado significa que as gotículas apresentam superfície externa com predominância de cargas negativas, provavelmente proveniente dos componentes das formulações, como da fosfatidilcolina de soja, que possui grupamentos ésteres livres, bem como o colesterol, que em sua estrutura possui uma hidroxila livre [OH-] (SILVA et al., 2016).

Frente aos resultados da avaliação do potencial antimicrobiano, podemos observar que o extrato puro de *B. holophylla* foi o mais ativo, sendo a cepa de *S. aureus* mais sensível, com valor de CIM de 500 µg/mL (caráter bacteriostático). No entanto, quando incorporado não inibiu o crescimento bacteriano, independente do sistema. *M. bella* apresentou CIM de 2000 µg/mL e manteve essa CIM apenas quando incorporado em SLN1. Contra *E. coli*, os extratos apresentaram CIM de 2000 µg/mL e quando incorporados em ambos sistemas não demonstraram potencial antibacteriano.

Diferenças na ultraestrutura da célula associadas à parede celular ou camadas de contorno celular acarretam diferentes sensibilidades aos compostos presentes nos extratos (MICELI et al., 2011). De acordo com Hendra et al., (2011), as bactérias Gram- negativas são geralmente mais resistentes, devido a barreira de permeabilidade da membrana externa, o que limita o acesso dos agentes antimicrobianos aos seus alvos nas células bacterianas.

Os resultados da atividade antifúngica foram mais promissores que da atividade antibacteriana, com graus variáveis de resistência e sensibilidade das espécies de *Candida* após o tratamento com as diferentes amostras.

M. bella teve um melhor potencial que *B. holophylla* frente a todas cepas testadas, sendo *C. glabrata* a espécie mais sensível à atividade inibitória de ambos extratos livres.

Quando incorporada, as formulações com *M. bella* apresentaram resultados semelhantes ao do extrato livre. A ação antifúngica do extrato foi potencializada somente após a incorporação em SLN1 frente a *C. glabrata* e em SLN2 contra *C. tropicalis*.

Com relação a incorporação de *B. holophylla*, os SLNs não proporcionaram melhora da atividade do extrato livre, além disso inibiram o potencial do extrato frente a *C. parapsilosis* e *C. albicans*.

A literatura não apresenta um consenso sobre avaliação de antimicrobianos em relação às CIMs. Aligiannis et al. (2001) consideram valores de CIM iguais ou inferiores a 500 µg/ mL como inibidores potentes, CIMs entre 600 µg/ mL e 1500 µg/ mL inibidores moderados e CIMs acima de 1600 µg/ mL como inibidores fracos. No entanto, Webster et al. (2008) estabeleceram valores de CIM iguais ou inferiores a 1000 µg/ mL como satisfatórios. Para este estudo, baseado na CLSI (2012), valores de CIM abaixo de 100 µg/ mL foram considerados como indicando boa atividade antimicrobiana; de 500 a 100 µg/ mL moderada e de 1000 a 500 µg/ mL fraca atividade. Sendo assim, o extrato de *B. holophylla* apresentou moderada atividade antibacteriana contra *S. aureus*, enquanto *M. bella* foi classificada com um fraco potencial de inibição. Frente as cepas de *Candida*, ambos apresentaram potentes efeitos inibitórios, exceto o extrato de *B. holophylla* frente a *C. parapsilosis* e *C. albicans* com moderado potencial antifúngico.

Considerando a importância medicinal dos microrganismos testados, os resultados deste estudo são considerados muito promissores na perspectiva da descoberta de novas drogas a partir de fontes vegetais.

Alguns extratos de Myrtaceae e Fabaceae já foram analisados como agentes antimicrobianos, devido principalmente sua constituição química rica em compostos fenólicos (SANTOS et al., 2018). No entanto, apesar do uso popular de *M. bella* e *B. holophylla*, não há dados sobre o efeito antimicrobiano. Assim, o interesse destas plantas é justificável por causa do seu potencial valor medicinal. Alguns fenólicos encontrados em plantas podem ser utilizados em terapias alternativas contra infecções convencionalmente resistentes ou como novos agentes antissépticos (SANTOS et al., 2018).

Sobre espécies de Myrtaceae, os estudos têm se concentrado nos óleos essenciais das folhas, flores, caule e frutos, por terem sesquiterpenos e monoterpenos como compostos majoritários na maioria deles (CERQUEIRA et al., 2007; CANDIDO et al., 2010; CASCAES et al., 2015). Estes terpenos são descritos como capazes de permear membranas celulares, devido à sua hidrofobicidade, o que causa a morte de microrganismos, afetando suas vias metabólicas ou organelas. Por isso, esses óleos podem ter atividade antimicrobiana contra patógenos humanos Gram-positivos e Gram-negativos (CASCAES et al., 2015; COWAN, 1999; JESUS et al., 2016; CARNEIRO et al., 2017).

Cerqueira et al. (2007) descrevem que as propriedades antimicrobianas do óleo de *M. myrtifolia* devem estar associadas ao alto teor de monoterpenos de hidrocarbonetos, especialmente ao seu componente majoritário, α -pinene. A atividade antimicrobiana deste composto foi relacionada à sua capacidade de destruição da integridade celular, inibição da respiração e do processo de transporte de íons e aumento da permeabilidade da membrana das células de levedura.

Recentemente, Da Silva Sá et al. (2017) demonstraram a ausência ou fraca atividade do extrato etanólico de *M. tomentosa* e suas frações contra a maioria das bactérias testadas e a potente atividade contra leveduras do gênero *Candida* e do complexo *Cryptococcus neoformans*; resultados que corroboram com o presente estudo. Os autores mostraram que o flavonoide quercetina-3-O- α -arabinofuranose é o principal responsável por essa atividade biológica.

Santos et al. (2018) testaram a atividade antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa dos extratos de *M. bella*, *M. fallax* e *M. guianensis*. *M. bella* e *M. fallax* apresentaram moderada atividade contra *E. coli* (300 e 250 µg/mL, respectivamente), *M. fallax* fraca atividade contra *Enterococcus hirae* (900 µg/mL) e *M. guianensis* fraca atividade contra *Rodococcus equi* (1000 µg/mL), estas duas últimas bactérias Gram-positivas. Os autores também justificam a atividade encontrada devido a constituição fenólica e aos taninos hidrolisáveis dos extratos.

Sobre o extrato de *M. bella* utilizado neste estudo, Saldanha et al. (2013) avaliaram o perfil quantitativo e qualitativo do extrato EtOH 70% de folhas de *M. bella*. Fragmentos diagnosticados no espectrômetro de massas obtidos por FIA-ESI-IT-MS no modo negativo em 285, 301 e 317 caracterizou agliconas como kaempferol, quercetina e miricetina, respectivamente, além de glicosilados principalmente de quercetina e miricetina. Os flavonoides heterosídeos derivados da quercetina foram os compostos majoritários. O composto quercetina-3-O- α -L-arabinofuranosídeo com 29,99 µg.mL⁻¹ foi o composto encontrado em maior concentração, seguido dos compostos quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo com 21,82 µg.mL⁻¹, quercetina-O- β -D-rhamnopiranosídeo com 15,81 µg.mL⁻¹ e quercetina-3-O- β -D-xilofuranosídeo com 14,06 µg.mL⁻¹.

Sabe-se que os flavonoides são sintetizados pelas plantas em resposta à infecção microbiana, explicando assim a atividade in vitro dessas substâncias contra uma ampla gama de microrganismos. Sua atividade é provavelmente devida à sua capacidade de se complexar com proteínas extracelulares e solúveis, e os flavonoides lipofílicos também podem romper a membrana microbiana (CARNEIRO et al., 2017).

A respeito das espécies do gênero *Bauhinia*, Ahmed et al. (2012) avaliaram dentre outras atividades, o potencial antimicrobiano de frações e extratos de *B. bowkeri*, *B. galpinii*, *B. petersiana* e *B. variegata*. Os ensaios mostraram que extratos brutos ricos em polifenóis e frações demonstraram vários graus de inibição do crescimento. Os autores relatam a correlação, embora não exclusiva, da atividade observada com a configuração estrutural, grupos funcionais e possíveis efeitos sinérgicos entre os compostos polifenólicos. Membros desta classe de compostos são conhecidos por possuírem propriedades bacteriostáticas ou bactericidas contra a maioria dos microrganismos, dependendo da estrutura e concentração utilizadas. O mecanismo de sua atividade antimicrobiana pode estar relacionado à sua capacidade de formar complexos com proteínas e polissacarídeos, inativando a capacidade de adesão

microbiana, enzimas e proteínas de transporte de envelope celular (TAGURI, TANAKA e KOUNO, 2004).

Rashed e Butnariu (2014) mostraram que o extrato metanólico de *B. racemosa* foi altamente ativo contra *C. albicans*, sugerindo sua possível utilização no tratamento de infecções fúngicas, além da atividade contra *Bacillus subtilis* e *Klebsiella pneumoniae*.

Correia et al. (2016) testaram a atividade anti-*Candida* de extratos de plantas do cerrado brasileiro, dentre elas, *B. rufa*, que revelou atividade contra *C. parapsilosis* (extrato aquoso) e *C. glabrata* (extrato aquoso e etanólico).

Sobre a análise fitoquímica previamente realizada durante a execução do projeto Biota-Fapesp com o extrato de folhas de *B. holophylla*, foi possível identificar quercetina-3-*O*- α -L-rhamnosídeo, quercetina-3-*O*- α -L-arabinosídeo, isorhamnetina, quercetina na forma aglicona, miricetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo, quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo, quercetina-3-*O*- β -D-xilopiranosídeo, quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo, quercetina-3-*O*- α -L-arabinofuranosídeo, luteolina e lithoespermosídeo (dados não publicados). Mas, de acordo com a literatura, o gênero *Bauhinia* é caracterizado pelo acúmulo de flavonoides livres e heterosídeos de flavonoides, assim como outras classes de compostos orgânicos de interesse medicinal, incluindo terpenoides, esteroides, taninos e quinonas (SILVA e CECHINEL FILHO, 2002). Assim, a atividade antimicrobiana observada no presente estudo pode ser devido a interação entre compostos bioativos no extrato.

O fato dos SLNs desenvolvidos no presente estudo não potencializarem o efeito antimicrobiano dos extratos pode estar relacionado com a propriedade reservatória das microemulsões, onde a fase interna constitui um microambiente dimensionalmente restrito, com propriedades particulares, podendo ligar ou associar moléculas com diferentes polaridades (OLIVEIRA et al., 2004).

No ensaio utilizando membranas de diálise, os resultados mostraram que a incorporação em SLN1 e SLN2 interfere significativamente no processo de liberação in vitro, produzindo inibição significativa da velocidade de liberação comparado aos extratos livres, o que sugere a retenção dos extratos nos SLNs. O estudo mostrou que o extrato de *M. bella* obteve uma liberação de aproximadamente 50% em 48 horas, enquanto que de *B. holophylla* foi cerca de 70%. Porém, as formulações não foram capazes de liberar os constituintes dos extratos através da membrana com a mesma

eficiência, ficando provavelmente retidos nas formas farmacêuticas. A interação dos extratos com os componentes dos sistemas foi observada nos resultados de FTIR.

Além do interesse na eficácia do extrato de plantas medicinais contra várias doenças, a segurança também é um fator importante na medicina tradicional. Há uma suposição crescente de que os produtos naturais são seguros. No entanto, estudos científicos provaram que vários fitoquímicos podem ser citotóxicos, genotóxicos e carcinogênicos quando consumidos excessivamente. A toxicidade é geralmente encontrada devido ao uso irracional, causando acúmulo de constituintes potencialmente tóxicos ou interações entre medicamentos à base de plantas e terapias convencionais (CAPARROZ-ASSEF et al., 2005; AHMED et al., 2012).

Em estudos anteriores, o extrato de *M. bella* utilizado neste estudo foi mutagênico nas linhagens TA98 e TA100, induzindo mutações do tipo substituição de pares de bases (TA100) e, a uma taxa muito mais elevada, mutações do tipo *frameshift* (TA98), enquanto que de *B. holophylla* teve sua mutagenicidade evidenciada na linhagem TA98 (dados não publicados; tabelas apresentadas no anexo II). Estes resultados motivaram o presente estudo a fim de utilizar as microemulsões como uma estratégia de aumentar o índice terapêutico com a conseqüente redução dos efeitos indesejáveis diante das diversas atividades biológicas/ farmacológicas que esses extratos possam ter.

Com relação a mutagenicidade avaliada pelo teste de Ames, a incorporação inibiu em parte a mutagenicidade apresentada pelos extratos livres; o número de revertentes não diferiu estatisticamente da taxa espontânea de reversão de cada linhagem de *Salmonella* (controle espontâneo), exceto o extrato de *B. holophylla* incorporado em SLN2 nos experimentos após ativação metabólica na linhagem TA98 que mostrou-se mutagênico, e os indícios de mutagenicidade observados na linhagem TA100 (com S9) e TA102 (sem S9) nos experimentos com *M. bella* em SLN2 e na linhagem TA100 (com S9) de *B. holophylla* incorporada em SLN2. Tais resultados também podem estar relacionados com o perfil reservatório dos SLNs, que se torna mais evidente quando analisado os resultados do tensoativo avaliado isoladamente. O tensoativo foi mutagênico nas linhagens TA100 (com e sem S9) e TA102 (sem S9), e tóxico nas linhagens TA98 (com e sem S9) e TA102 (com S9). No entanto, quando nos SLNs, não induziu qualquer efeito mutagênico.

A respeito da citotoxicidade, as bases dos sistemas por si só foram citotóxicas, SLN1 mais que SLN2, por isso os extratos incorporados tiveram um potencial citotóxico evidentemente maior que os extratos livres. Esses resultados foram justificados pela citotoxicidade observada do tensoativo quando testado isoladamente, mostrando que o efeito citotóxico dos extratos incorporados teve interferência dos componentes dos SLNs.

Os resultados mostraram que, a princípio, não há seletividade, pois as amostras foram citotóxicas na linhagem normal e nas tumorais. O comportamento diferencial das linhagens celulares pode ser devido a diferentes características moleculares dessas células. No entanto, independente disso, esses resultados despertam o interesse para outras investigações com relação ao uso dessas formulações como possíveis antitumorais.

Sobre os extratos vegetais utilizados neste estudo, Vareda et al. (2014) mostraram que a relação entre o peso renal e o peso corporal de camundongos aumentou 12,1% com a administração de altas doses do extrato de *M. bella* (2000 mg/ kg p.c.), indicando um possível grau de toxicidade do extrato quando em excesso. Serpeloni et al. (2015) demonstraram que a frequência de brotos nucleares em células tumorais induzida por *M. bella* foi quase cinco vezes maior que o grupo controle negativo, sugerindo que o extrato possui atividade mutagênica baseada neste parâmetro. A atividade mutagênica foi relacionada ao efeito oxidante do extrato nas células tumorais.

Ribeiro et al. (2017) mostraram que em concentrações superiores a 7,5 µg/ mL (entre 10 e 50 µg/ mL), o extrato de *B. holophylla* foi citotóxico, induziu apoptose e causou efeitos antiproliferativos em células HepG2.

Frente aos resultados observados, o presente estudo fornece suporte às propriedades antimicrobianas dos extratos de *M. bella* e *B. holophylla*, contribuindo na busca de novos produtos naturais com atividades biológicas e sugerindo cautela do uso para fins medicinais. Além disso, a identificação definitiva dos mecanismos de ação é a chave para o desenvolvimento farmacológico, permitindo a antecipação de problemas relacionados com a segurança clínica e resistência à droga (CUSHNIE e LAMB, 2011). Sendo assim, mais estudos toxicológicos e farmacológicos devem ser realizados para complementar os resultados deste trabalho.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

O estudo sobre o potencial antimicrobiano e toxicogenético dos extratos EtOH70% de folhas de *M. bella* e *B. holophylla* incorporados e não incorporados em microemulsões, levou as seguintes conclusões:

- As formulações constituídas com 10% de fase oleosa (OSU e colesterol - SLN1, apenas colesterol – SLN2), 10% de tensoativo (polioxietileno 20 cetil éter (Brij[®] 58) + fosfatidilcolina de soja) e 80% de fase aquosa (PBS) contém características que sugerem microemulsões óleo em água;

- O OSU colabora em alterar a viscosidade do sistema, deixando-o mais aquoso e transparente;

- O diâmetro hidrodinâmico médio de todas as amostras testadas está dentro da faixa de 10-250 nm (100-2500 Å), intervalo ideal para SLN do tipo microemulsão, além disso, os valores de IPD indicam que as amostras são homogêneas e PZ com valores negativos provavelmente está relacionado com as cargas negativas provenientes dos componentes das formulações;

- Os resultados de FTIR sugerem a possibilidade de interação dos componentes dos extratos com os sistemas;

- Os extratos não incorporados foram mais eficazes que os incorporados contra *E. coli* e *S. aureus*; o extrato puro de *B. holophylla* foi o mais ativo, sendo a cepa de *S. aureus* mais sensível;

- Com relação a atividade antifúngica, os resultados foram mais promissores que da atividade antibacteriana; os extratos apresentaram efeito frente a todas as cepas testadas, sendo que *M. bella* teve melhor atividade que *B. holophylla* e *C. glabrata* a espécie mais sensível à atividade inibitória de ambos extratos livres;

- As formulações apresentaram resultados semelhantes aos dos extratos livres, exceto que a ação antifúngica de *M. bella* foi potencializada quando incorporada em SLN1 frente a *C. glabrata* e em SLN2 contra *C. tropicalis* e inibida frente a *C. parapsilosis* e *C. albicans* quando *B. holophylla* foi incorporada em ambos sistemas;

- Os extratos incorporados foram mais citotóxicos que os livres frente as linhagens celulares testadas, provavelmente devido a citotoxicidade dos componentes das bases dos sistemas, como observado nos resultados com o tensoativo;

- A incorporação inibiu em parte a mutagenicidade apresentada pelos extratos livres, exceto o extrato de *B. holophylla* em SLN2 (TA98 com S9).

- Os resultados do ensaio de liberação in vitro mostraram que a incorporação em SLN1 e SLN2 interfere significativamente no processo de liberação dos extratos, sugerindo a retenção dos extratos nos SLNs. O perfil reservatório dos SLNs justifica, em parte, os resultados da avaliação do potencial antimicrobiano e mutagênico deste trabalho.

Referências Bibliográficas

Se chegarmos ao término de uma guerra de forma digna, vivo ou morto, sempre será um triunfo. (Gabriel Marena)

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOOFAZELI, R.; PATEL, N.; THOMAS, M.; LAWRENCE, M. Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. IV. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-alcohol and oil; the influence of oil. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 17, p. 107-116, 1995.

AHMED, A. S.; ELGORASHI, E. E.; MOODLEY, N.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, V.; ELOF, J. E. The antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African Bauhinia species used traditionally to treat diarrhoea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 826 – 839, 2012.

ALIGIANNIS, N., KALPOUTZAKIS, E., MITAKU, S., CHINO, I. B. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species. **Journal Agric. Food Chemistry**. v. 49, p. 4168 – 4170, 2001.

ALLOCATI, N; MASULLI, M; ALEXEYEV, M. F; DI LLIO, C. Escherichia coli in Europe: An Overview. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, p. 6235-6254, 2013.

ANVISA. Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde, 2017.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 444-447, 2007.

BEBER, A. P.; SOUZA, P.; BOEING, T.; SOMENSI, L. B.; MARIANO, L. N.; CURY, B. J.; BURICI, L. M.; SILVA, C. B.; SIMIONATTO, E.; ANDRADE, S. F.; SILVA, L. M. Constituents of leaves from *Bauhinia curvula* Benth. exert gastroprotective activity in rodents: role of quercitrin and kaempferol. **Inflammopharmacology**, v 26, p. 539 – 559, 2017.

BICALHO, G. O. D.; CARDOSO, M. D. G.; SILVA, V. D. F.; MUNIZ, F. R.; CASTRO, E. M. D.; GAVILANES, M. L. Estudo Morfológico das Folhas de *Bauhinia holophylla* Steud. **Caderno de Pesquisa Sér. Bio., Santa Cruz do Sul**, v. 17, p. 13-19, 2005.

COELHO, H.; MATINATTI, A. N. F.; ARAUJO, M. B.; BERGOLD, A. M.; BUENO, F. Análise químico-farmacêutica do fluconazol e especialidade farmacêutica cápsula. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, 2004.

BRONZWAER, S. L.; CARS, O.; BUCHHOLZ, U.; MOLSTAD, S.; GOETTSCHE, W.; VELDHUIZEN, I. K.; KOOL, J. L.; SPRENGER, M. J. W.; DEGENER, J. E. EMERGING INFECTIOUS DISEASES. The Relationship between Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 278-282, 2002.

BONIFÁCIO, B. V.; RAMOS, M. A.; DA SILVA, P. B.; NEGRI, K. M.; DE OLIVEIRA LOPES, E.; DE SOUZA, L. P.; VILEGAS, W.; PAVAN, F. R.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. Nanostructured lipid system as a strategy to improve the anti-*Candida albicans* activity of *Astronium sp.* **International journal of nanomedicine**, v. 2015:10(1), p.5081-5092, 2015.

BONIFÁCIO, B. V.; SILVA, P. B.; RAMOS, M. A.; NEGRI, K. M.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International journal of nanomedicine**, v. 9:1-15, 2014.

CANDIDO, C. S.; PORTELLA, C. S. A.; LARANJEIRA, B. J.; SILVA, S. S.; ARRIAGAS, A. M. C.; SANTIAGO, G. M. P.; GOMES, G. A.; ALMEIDA, P. A.; CARVALHO, C. B. M. Effects of *myrcia ovata* cambess. essential oil on planktonic growth of gastrointestinal microorganisms and biofilm formation of *enterococcus faecalis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 621 – 627, 2010.

CARNEIRO, N. S.; ALVES, C. C. F.; ALVES, J. M.; MARTINS, C. H. G.; SILVA, T. S.; BRETANHA, L. C.; BALLESTE, M. P.; MICKE, G. A.; SILVEIRA, E. V. Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Essential Oils from Leaves and Flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). **Brazilian Academy of Science**, v. 89, p. 1907–1915, 2017.

CAPARROZ-ASSEF, S. M.; GRESPAN, R.; BATISTA, R. C. F.; BERSANI-AMADO, F. A.; BARONI, S.; DANTAS, J. A.; CUMAN, R. K. N.; BERSANI-AMADO, A. C. Toxicity studies of *Cordia salicifolia* extract. **Acta Scientiarum Health Science**, v. 27, p. 41 – 47, 2005.

CASCAES, M. M.; GUILHON, G. M. S. P.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B. Z.; SANTOS, L. S. Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. **International Journal of Molecular Science**, v. 16 (10), p. 23881-23904, 2015.

CERQUEIRA, M. D.; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. O.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. Seasonal Variation and Antimicrobial Activity of *Myrcia myrtifolia* Essential Oils. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 18, p. 998 – 1003, 2007.

CORREIA, A. F.; SILVEIRA, D.; BAZZO, Y. M. F.; MAGALHAES, P. O.; FAGG, C. W.; SILVA, E. C.; GOMES, S. M.; GANDOLF, L. Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, p. 203, 2016.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology**, v. 12, p. 564–582, 1999.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards-9^a ed. Document M7-A7 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts, approved standards, CLSI document M27-A3, Wayne, PA, 2008.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**, 9th ed.; CISI:Wayne, PA, USA, 2012; Volume 32.

CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal antimicrobial agents**, v. 38, p. 99 – 107, 2011.

DA SILVA SÁ, F. A.; DE PAULA, J. A. M.; DOS SANTOS, P. A.; DE ALMEIDA R.; OLIVEIRA, G.; LIÃO, L. M.; DE PAULA, J. R.; DO ROSÁRIO, S. M. Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC. **Leaves Molecules**, v. 22, p., 2017.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v 97, n.2, p. 305-311, 2005.

ESPANHA, L. G.; RESENDE, F. A.; NETO, J. S. L.; BOLDRIN, P. K.; NOGUEIRA, C. H.; CAMARGO, M. S.; DE GRANDIS, R. A.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenicity and antimutagenicity of six Brazilian *Byrsonima* species assessed by the Ames test. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 1-10, 2014.

European Centre for Disease Prevention and Control. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS), 2010. Disponível em: Disponível em: <http://www.ecdc.europa.eu/>. Acesso em: 27 de Jul. 2018.

FARGHALY, D. A.; ABOELWAF, A. A.; HAMZA, M. Y.; MOHAMED, M. I. Microemulsion for Topical Delivery of Fenopfen Calcium: In-vitro and In-vivo Evaluation. **Journal of Liposome Research**, v. 6, p. 1-11, 2017.

FENG, G.; XIONG, Y.; WANG, H.; YANG, Y. Gelation of microemulsions and release behavior of sodium salicylate from gelled microemulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 297 – 302, 2009.

FISCHER, M. C.; HAWKINS, N. J.; SANGLARD, D.; GURR, S. J. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v 360, p. 739 – 742, 2018.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 10 jul. 2018

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, p. 01, 2010.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, nº 2, 2006.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de pesquisa**, v. 18, p. 90-95, 2011.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; JÚNIOR, A. A. S.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, 2005.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELOV, A.; KUHN, I.; MCKENZIE, D.; MOLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and

spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **J. Microbiol. Methods**, v. 50, p. 63-73, 2002.

GEDDES-MCALISTER, J.; SHAPIRO, R. S. New pathogens, new tricks: emerging, drug-resistant fungal pathogens and future prospects for antifungal therapeutics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 40, p. 1 – 22, 2018.

GHOSH, V.; SARANYA, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 105, p. 152–157, 2013.

GRILL, A. E.; JOHNSTON, N. W.; SADHUKHA, T.; PANYAM, J. A review of select recent patents on novel nanocarriers. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, p. 137–142, 2009.

GOYAL, U., ARORA, R., AGGARWAL, G. Formulation design and evaluation of a self-microemulsifying drug delivery system of lovastatin. **Acta Pharmaceutical**, v. 62, n. 3, p. 357-370, 2012.

GUDIÑA, E. J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A 20. **Lett. Appl. Microbiology.**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.

GUPTA, S.; MOULIK, S. P. Biocompatible microemulsions and their prospective uses in drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 97, p. 22 – 45, 2008.

HAWSER, S.; ISLAM, K. Compared to the effects of fungicides and Fungistáticos antifungal agents in the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 43, p. 411-413, 1999.

HENDRA, R.; AHMAD, S.; OSKOUFIAN, E.; SUKARI, A.; SHUKOR, M. Y. Antioxidant, Anti-inflammatory and Cytotoxicity of *Phaleria macrocarpa* (Boerl.) Scheff Fruit. **Complementary e Alternative Medicine**, v. 11, p. 110, 2011.

HÖRNER, M.; GIGLIO, V. F.; SANTOS, A. J. R. W. A.; WESTPHALEN, A. B.; IGLESIAS, B. A.; MARTINS, P. R.; AMARAL, C. H.; MICHELOT, T. M.; REETS, L. G.; BERTONCHELI, C. M.; PARAGINSKI, G. L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

Hexa Research. Herbal Medicine Market Size and Forecast, By Product (Tablets & Capsules, Powders, Extracts), By Indication (Digestive Disorders, Respiratory Disorders, Blood Disorders), And Trend Analysis, 2014 – 2024. 2018. Disponível em: <<https://www.hexaresearch.com/research-report/global-herbal-medicine-market>>. Acesso em: 10 de Jul. 2018.

JESUS, I. C.; FRAZÃO, G. G. S.; BLANK, A. F.; SANTANA, L. C. L. A. *Myrcia ovata* Cambessedes essential oils: A proposal for a novel natural antimicrobial against foodborne bacteria. **Microbial Photogenesis**, v. 99, p. 142 – 147, 2016.

JORGE, L. I. F.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA, M. L. P. Anatomia foliar de Pedra- hume- cáa (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia puniceifolia* – MYRTACEAE). **Acta Amazonica**, v. 30, p. 49-57, 2000.

KAUR, G.; MEHTA, S. K. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, Toxicity and antimicrobial applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, p. 134 – 160, 2017.

KO, R. J. Causes, epidemiology, and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. **Clin Toxicol**, v. 37, p. 697-708, 1999.

KUMAR, M., CURTIS, A., HOSKINS, C. Application of Nanoparticle Technologies in the Combat against Anti-Microbial Resistance. **Rev. Pharmaceutics**, v. 10, p. 11, 2018.

LAZZARINI, J. R. Mercado de fitoterápicos e inovação. In X Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2015. Disponível em:

<http://www.plamevasf.univasf.edu.br/arquivos_anais/info_gerais.pdf> Acesso em: 27 jul. 2018.

LAWRENCE, M.J. Microemulsions as Drug Delivery Vehicles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 1, p. 826 – 832, 1996.

LOUREIRO, R. J; ROQUE, F; RODRIGUES, A. T; HERDEIRO; M. T, RAMALHEIRO, E. Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. **Rev. Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, p. 77-84, 2016.

MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO, P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. **Current Drug Delivery**, v. 3, p. 275–285, 2006.

MAZZOLIN, L. P.; NASSER, A. L. M.; MORAES, T. M.; SANTOS, R. C.; NISHIJIMA, C. M.; SANTOS, F. V.; VARANDA, E. A.; BAUAB, T. M.; ROCHA, L. R. M.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W.; LIMA, C. A. H. *Qualea parviflora* Mart.: An integrative study to validate the gastroprotective, antidiarrheal, antihemorrhagic and mutagenic action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 508 - 514, 2010.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A.; Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. 2011. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infect Diseases**, v. 11, p. 142 – 151, 2011.

MOGHIMIPOUR, E.; SALAMI, A.; KARAMI, M.; ISAZADEH, S. Preparation and characterization of dexamethasone microemulsion based on pseudoternary phase diagram. **Jundishapur Journal Natural Pharmaceutical Products**, v. 8, p. 105 – 112, 2013.

MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTI, S. G. The excited states quenching of resazurin and resofurin and resofurin by p. benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**, n 64, p. 117 –m 124, 2005.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

OBEIDAT, W. M.; SCHWABE, K.; MULLER, H. R.; KECK, M. C. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, p. 56 – 67, 2010.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. G. Microemulsões I: Fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. **Informa**, v. 13, p. 9 – 10, 2001.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CERA, L. F. R. Microemulsões II: aplicações de liberação de fármacos Microemulsions II: applications for drug delivery. **Infarma Ciências Farmacêuticas**, v. 14, p. 76–80, 2002.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: Estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, p. 131 – 138, 2004.

PAGE, B.; PAGE, M.; NOEL, C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. **International Journal Oncology**, v. 3, p. 473-476, 1993.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO., GUERRA, R.; SWNGS, J.; PORTAESL, F. Resazurin microviter asway plate: simple and inexpensive methol for detection og drog resistence in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v 46 n 8, p. 2720 – 2722, 2002.

PINHEIRO, M.; RODRIGUES, L. S.; NETO, L. S.; SOUZA, R. Q. M.; SOARES, T. S.; AMÉRICO, M. F.; CAMPOS, K. E.; DAMASENO, D. C.; VOLPATO, G. Effect of *Bauhinia holophylla* treatment in Streptozotocin-induced diabetic rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 263-272, 2017.

PORTAL DA SAÚDE. 2009. MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-antioresidencia-saude/3487>>. Acesso em: 27 de Jul. 2018.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R.; **Tecnologia Farmacêutica**, v. 1, 5^a ed., Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1995, p. 199-478.

RAMOS, M. A. S. *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland: Caracterização biológica e prospecção terapêutica do extrato metanólico incorporado ou não em sistema nanoestruturado para aplicação no tratamento da candidíase vulvovaginal. 2015, 153f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2015.

RAJENDRAN, R.; RADHAI, R.; KOTRESH, T. M.; CSISZAR, E. Development of antimicrobial cotton fabrics using herb loaded nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 613–617, 2013.

RASHED, K.; BUTNARIU, M. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Bauhinia racemosa* Lam. and Chemical Content. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, p. 1073 – 1080, 2014.

RIBEIRO, D. L.; CILIÃO, H. L.; SPECIAN, A. F. L.; SERPELONI, J. M.; OLIVEIRA, M. T.; VARANDA, E. A.; VILEGAS, W.; SALDANHA, L. L.; LOPEZ, W. M.; DOKKEDAL, A. L.; COLU, I. M. S. Phytochemical study and evaluation of cytotoxicity, mutagenicity, cell cycle kinetics and gene expression of *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. in HepG2 cells in vitro. **Cytotechnology**, v. 70, p. 713 – 728, 2017.

ROZZA, A. L.; CESAR, D. A. S.; PIERONI, L. G.; SALDANHA, L. L.; DOKKEDAL, A. L.; DE-FARIA, F. M.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. TAKAHIRA, R. K.; PELLIZZON, C. H. Antiulcerogenic activity and toxicity of *Bauhinia holophylla*

hydroalcoholic extract. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015:439506, 2015.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSⁿ and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. **Molecules**, v. 18, p. 8402-8416, 2013.

SANTOS, C; GALAVERNA, R. S; ANGOLINI, C. F. F; NUNES, V. V. A; ALMEIDA, L. F. R; RUIZ, A. L. T; CARVALHO, J. E; DUARTE, R. M. T; DUARTE, M. C. T; EBERLIN, M. N. Antioxidative, Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Phenolic Compounds from Three *Myrcia* Species. **Molecules**, v. 23, p. 986, 2018

SEM, T.; SAMANTA, S. K. Medicinal Plants, Human Health and Biodiversity: A Broad Review. **Biochem Eng Biotechnol**, v. 147, p. 59 – 110, 2014.

SERPELONI, J. M.; SPECIAN, A. F. L.; RIBEIRO, D. L.; TUTTIS, K.; VILEGAS, W.; LOPES, W. M.; DOKKEDAL, A. L.; SALDANHA, L. L.; COLUS, I. M. S.; VARANDA, E. A. Antimutagenicity and induction of antioxidant defense by flavonoid rich extract of *Myrcia bella* Cambess. in normal and tumor gastric cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 345–355, 2015.

SHINODA, K.; ARAKI, M.; SADAGHIANI, A.; KHAN, A.; LINDMAN, B. Lecithin-based micromulsions: Phase behaviour and microstructure. **Journal of Physical Chemistry**, v. 95, p. 989 – 993, 1991.

SILVA, P. B.; FREITAS, E. S.; BERNEGOSI, J.; GONÇALEZ, M. L.; SATO, G.; LEITE, C. Q.; PAYAN, F. R.; CHORILLI, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Treatment of Tuberculosis. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, p. 241–260, 2016

SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 95, p. 173–183, 2004.

SPONCHIADO, G.; ADAM, M. L.; SILVA, C. D.; SOLEY, B. S.; SAMPAYO, C. M.; CABRINI, D. A.; CORRER, A. J.; OTUKI, M. F. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 289-296, 2016.

TAGURI, T.; TANAKA, T.; KOUNO, I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne diseases. **Biological and Pharmacological Bulletin**, v. 27, p. 1965–1969, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 289-306, 2006.

TYLER, V. E. Natural products and medicine: an overview. In: Balick MJ, Elisabetsky E, Laird SA. Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health. **Columbia University Press**, p. 3-10, 1996.

VAREDA, P. M. P. Avaliação da atividade hipoglicimante do extrato de *Myrcia bella* em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina. 2013. 80f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2013.

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

VENUGOPAL, J.; PRABHAKARAN, M. P.; LOW, S.; CHOON, A. T.; DEEPIKA, G.; DEV, V. R.; RAMAKRISHNA, S. Continuous nanostructures for the controlled release of drugs. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, 1799–1808, 2009.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R. J.; SAND, C.; RENNIE, R. P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 140 – 146, 2008.

World Health Organization (OMS). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>> Acesso em 10 Jul 2018.

Anexos

Podem tirar o seu chão, mas demonstre que tem forças suficiente de criar asas e voar. (Gabriel Marena)

ANEXO I

Atividade antimicrobiana

Ágar Miller Hilton (AMH): Difco-225250, 500g

38 g de ágar foi adicionado em 1L de água purificada e aquecido em microondas até a solubilização total do meio. Em seguida, foi autoclavado e plaqueado.

Caldo Miller Hilton (CMH): Difco-275730, 500g

21 g do caldo foi adicionado em 1L de água purificada e aquecido em microondas até a solubilização total do caldo. O caldo foi autoclavado em tubos de 3 mL, 5 mL, 10 mL e 50 mL (à meia rosca) e mantidos em temperatura de geladeira até o dia do uso.

Ágar sabouraud (AS): Difco 210950, 500g

65g do ágar foi adicionado em 1L de água purificada e aquecido em microondas até a solubilização total do ágar. Em seguida, foi autoclavado e plaqueado.

Caldo sabouraud (CS): Difco-238230, 500g

30 g do caldo foi adicionado em 1L de água purificada e aquecido em microondas até a solubilização total. O caldo foi autoclavado em tubos de 3 mL, 5 mL, 10 mL e 50 mL (à meia rosca) e mantidos em temperatura de geladeira até o dia do uso.

Meio RPMI 1640

- RPMI -----	10,4g
- Tampão MOPS -----	35,4g
- Glicose-----	19,0g
- Água MilliQ-----	1000 mL

Após a pesagem, o meio foi dissolvido em 900 mL de água MilliQ, acrescentando o MOPS (concentração final 0,165mol/L) e agitando até dissolver. O pH foi ajustado para 7,0-7,2 em temperatura ambiente, utilizando hidróxido de sódio 1 mol/L e depois acrescentou-se água até o volume de 1L. Por fim, o meio foi esterilizado em filtração com membrana e armazenado em geladeira até o uso.

Ensaio de mutagenicidade

Caldo nutriente:

0,75g de Meio Oxoid foi adicionado e solubilizado em 30 mL de água destilada. Autoclavar em 121°C por 15 minutos. Manter em temperatura de geladeira até o dia de uso.

Top ágar:

1,2 g de Agar e 1,0 g de NaCl foram adicionados e solubilizados em 200 mL de água destilada. Autoclavar em 121°C por 15 minutos. Manter em temperatura de geladeira até o dia de uso.

Solução de Histidina/Biotina (0,5 mM):

0,00247 g de Biotina e 0,00192 g de Histidina foram adicionados e solubilizados em 20 mL de água destilada. Autoclavar em 121°C por 15 minutos. Manter em temperatura de geladeira até o dia de uso.

Agar mínimo glicosado (AGM):

7,5g de Agar foi adicionado e solubilizado em 465 mL de água destilada. Autoclavar em 121°C por 15 minutos. Após a autoclavagem, adicionar 25 mL de glicose (40 ou 8%) e 10 mL de VB. Por fim, plaquear o meio e guardar as placas em estufa a 37°C por 48 h. Após incubação, manter as placas guardadas em geladeiras até o dia de uso.

VB (Vogel Bonner E):

0,75 g de Sulfato de magnésio, 7,5 g de Ácido cítrico, 37,5 g de Fosfato de potássio dibásico, 13,13 g de Fosfato de sódio e amônio foram adicionados e solubilizados

sequencialmente em 50,25 mL de água destilada (45°C). Autoclavar em 121°C por 15 minutos

Tampão fosfato (0,2 M):

Solução estoque A:

2,84g (Na₂HPO₄).....100mL (água destilada)

Solução estoque B:

2,76g (NaH₂PO₄).....100mL água destilada)

Solução de uso: Misturar 30 mL da solução A e 7mL da solução B. Ajustar o pH (7,4).

Autoclavar em 121°C por 15 minutos

Solução de MgCl (0,4 M):

MgCl₂.6H₂O.....8,13g

H₂O destilada.....100mL

Autoclavar em 121°C por 15 minutos

- Solução de KCl (1,65M):

KCl.....12,3g

H₂O.....100mL

Autoclavar em 121°C por 15 minutos

Solução de glicose 6-fosfato (G-6-P) 1M:

G-6-P.....2,821g

H₂O destilada (estéril).....10 mL

Solução NAPD (0.1 M):

NAPD.....0,7654g

H₂O destilada (estéril).....10mL

ANEXO II

Tabela I- Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* após o tratamento com extrato EtOH 70% das folhas de *Bauhinia holophylla*, em diferentes concentrações, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica

Tratamentos	Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM					
	TA 98		TA 100		TA 102	
mg/placa	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
0,0^a	16 ± 1	23 ± 2	146 ± 10	122 ± 13	262 ± 63	243 ± 31
0,62	28 ± 5* (1,7)	40 ± 8* (1,7)	169 ± 6 (1,2)	165 ± 16 (1,3)	303 ± 41 (1,2)	319 ± 14 (1,3)
1,25	37 ± 4** (2,3)	45 ± 9* (1,9)	166 ± 13 (1,1)	176 ± 14 (1,4)	297 ± 37 (1,1)	321 ± 64 (1,3)
2,50	61 ± 5** (3,8)	58 ± 2** (2,5)	190 ± 26 (1,3)	157 ± 29 (1,3)	284 ± 64 (1,1)	331 ± 36 (1,4)
3,75	93 ± 9** (5,8)	64 ± 6** (2,8)	197 ± 36 (1,3)	179 ± 26 (1,5)	226 ± 30 (0,9)	329 ± 51 (1,4)
5,00	94 ± 15** (5,9)	84 ± 2** (3,7)	205 ± 16 (1,4)	160 ± 27 (1,3)	239 ± 68 (0,9)	269 ± 23 (1,1)
C +	1105 ± 123 ^b	1206 ± 97 ^e	1412 ± 74 ^c	1428 ± 105 ^e	2056 ± 197 ^d	1885 ± 156 ^f

*P < 0,05 (ANOVA); **P < 0,01 (ANOVA), M ± DP = média e desvio padrão; ^aControle negativo: DMSO, dimetilsulfóxido: 100 µL/placa; Controle positivo (C+): ^b4-nitro-*o*-fenilenodiamino (10,0 µg/ placa – TA98); ^cAzida Sódica (1,25 µg/placa – TA100); ^dMitomicina C (0,5 µg/ placa – TA102), em ausência de S9 e ^e2-aminoantraceno (1,25 µg/ placa – TA98, TA100); ^f2-aminofluoreno (10 µg/ placa – TA102), na presença de S9.

Tabela II - Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* após o tratamento com extrato EtOH 70% de folhas de *Myrcia bella*, em diferentes concentrações, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica

Tratamentos	Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM					
	TA 98		TA 100		TA 102	
mg/placa	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
0,0^a	23 ± 2	22 ± 3	124 ± 10	100 ± 7	721 ± 39	500 ± 58
0,62	58 ± 10** (2,5)	88 ± 7** (3,9)	147 ± 13 (1,2)	183 ± 25* (1,8)	633 ± 40 (0,9)	591 ± 77 (1,2)
1,25	95 ± 24** (4,2)	123 ± 13** (5,5)	166 ± 11 (1,3)	211 ± 22** (2,1)	585 ± 64 (0,8)	621 ± 26 (1,2)
2,50	154 ± 21** (6,8)	148 ± 25** (6,6)	162 ± 6 (1,3)	228 ± 20** (2,3)	691 ± 38 (1,0)	592 ± 55 (1,2)
3,75	163 ± 17** (7,2)	155 ± 17** (7,0)	132 ± 8 (1,1)	245 ± 24** (2,5)	540 ± 39 (0,7)	600 ± 45 (1,2)
5,00	176 ± 25** (7,8)	160 ± 14** (7,2)	91 ± 12 (0,7)	210 ± 14** (2,1)	529 ± 16 (0,7)	524 ± 63 (1,0)
C +	1347 ± 88 ^b	1567 ± 115 ^e	1682 ± 98 ^c	1956 ± 78 ^e	2656 ± 60 ^d	2932 ± 97 ^f

*P < 0,05 (ANOVA); **P < 0,01 (ANOVA), M ± DP = média e desvio padrão; ^aControle negativo: DMSO, dimetilsulfóxido: 100 µL/placa; Controle positivo (C+): ^b4-nitro-*o*-fenilenodiamino (10,0 µg/ placa – TA98); ^cAzida Sódica (1,25 µg/placa – TA100); ^dMitomicina C (0,5 µg/ placa – TA102), em ausência de S9 e ^e2-aminoantraceno (1,25 µg/ placa – TA98, TA100); ^f2-aminofluoreno (10 µg/ placa – TA102), na presença de S9.