

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
UNIFAL-MG

**NATÁLIA MARIA NORONHA**

**PESQUISA DE BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS  
HIDROETANÓLICOS DE *Ficus pumila* L.  
(Moraceae)**

Alfenas/MG

2014

**NATÁLIA MARIA NORONHA**

**PESQUISA DE BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS  
HIDROETANÓLICOS DE *Ficus pumila* L.  
(Moraceae)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Linha de Pesquisa: Atividade biológica de produtos de interesse farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco

Co-orientador: Dr<sup>a</sup>. Ingridy S. Ribeiro Cabral

Alfenas/MG

2014

Noronho, Natália Maria.

Pesquisa de bioativos e avaliação da atividade biológica de extratos hidroetanólicos de *Ficus pumila* L. (Moraceae) / Natália Maria Noronho. - 2014.

50 f. -

Orientador: Jorge Kleber Chavasco.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. *Ficus*. 2. Efeito antioxidante. 3. Antimicrobianos. I. Chavasco, Jorge Kleber. II. Título.

CDD: 581.634

**NATÁLIA MARIA NORONHA**

**PESQUISA DE BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS  
HIDROETANÓLICOS DE *Ficus pumila* L.  
(Moraceae)**

A Banca examinadora abaixo-assinada,  
aprova a Dissertação apresentada como  
parte dos requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela  
Universidade Federal de Alfenas.  
Área de concentração: Ciências  
Farmacêuticas.

Aprovada em: 14-02-2014

Prof. JORGE KLEBER CHAVES

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof. MARCOS JOSÉ MARQUES

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof. Jua Potência Fênica Castro

Instituição: UFSJ

Assinatura:



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco e à minha co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Ingridy S. Ribeiro Cabral pela dedicação, conhecimentos transmitidos e confiança depositada na realização deste trabalho.

Aos meus pais José Oswaldo Noronha e Maria de Fátima Noronha, às minhas irmãs Nayara, Letícia e Maria Júlia, ao meu namorado Thiago e aos meus amigos pelo apoio, confiança e amizade.

## RESUMO

O uso de produtos naturais, principalmente de origem vegetal, na terapêutica medicinal representa a forma mais antiga e difundida de medicação. *Ficus pumila*, planta amplamente utilizada na ornamentação de muros e paredes, conhecida como hera-miúda ou unha-de-gato, apresenta inúmeras atividades biológicas. Pela população é utilizada como antitumoral, antiinflamatório, tônico e no tratamento de doenças como diabetes e hipertensão. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a composição química e as atividades antimicrobiana e antioxidante, além da citotoxicidade de extratos hidroetanólicos de caule, raiz, folhas e frutos secos e frescos de *Ficus pumila*. Em relação à composição química, os resultados encontrados revelaram a presença de taninos e flavonoides em todos os extratos. O maior teor de compostos fenólicos foi exibido pela raiz seca (724,39 mg AG/g) e o menor pelo caule fresco (84,8 mg AG/g). O maior teor de flavonoides foi apresentado pela folha seca (15,30 mg quercetina/g) e o menor pelo caule seco (1,29 mg de quercetina/g). Os testes microbiológicos indicaram a atividade dos extratos contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis*. Os melhores resultados foram exibidos pelos extratos de caule e raiz. Os extratos não apresentaram atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* H37 e *Mycobacterium bovis* (BCG). A maior atividade antioxidante foi demonstrada pelo extrato de caule fresco (12,81 µg/mL) e a menor pelo extrato de folha fresca (58,56 µg/mL). A avaliação da citotoxicidade frente à cultura celular revelou a ausência de citotoxicidade dos extratos de caule, raiz e fruto nas concentrações testadas. Concluiu-se que *Ficus pumila* pode ser, no futuro, uma fonte de compostos antioxidantes e antimicrobianos para o desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: *Ficus pumila*. Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

The use of natural products, mainly of vegetable origin in medical therapy is the oldest form of medication and widespread. *Ficus pumila* plant widely used in the decoration of walls and partitions, known as Ivy - girl or cat's claw, has numerous biological activities. By population is used as antitumor, anti-inflammatory, tonic and also for the treatment for some diseases such as diabetes and hypertension. In this context, the present work aimed to study the chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities, beyond the cytotoxicity of hydroethanolic extracts of root, stalk, leaves and dried and fresh fruits of *Ficus pumila*. Regarding the chemical composition, the results revealed the presence of tannins and flavonoids in all extracts. The higher content of phenolic compounds was screened by dried root (724.39 mg AG / g) and the lowest by the fresh stem (84.8 mg AG/ g). The highest content of flavonoids was presented by drought (15.30 mg quercetin/ g) and the lowest by dry leaf stem (1.29 mg quercetin/ g). Microbiological tests indicated the activity of the extracts against *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis*. The best results were shown by the extracts of stem and root. The extracts showed no activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* H37 (BCG). The highest antioxidant activity was shown by extracts of fresh stem (12.81 mg/ mL) and lowest for fresh leaf extract (58.56 mg/ mL). The cytotoxicity against the cell culture revealed the absence of cytotoxicity of extracts of root, stalk and fruit concentrations tested. It was concluded that *Ficus pumila* may be in the future a source of antioxidants and antimicrobial compounds for drug development.

Keywords: *Ficus pumila*. Antioxidant activity. Antimicrobial activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspecto geral de <i>Ficus pumila</i> . .....	17
Figura 2: Teste de difusão para micobactérias. Controle positivo à esquerda (Rifampicina) e negativo à direita (água destilada). .....	25
Figura 3: Concentração Inibitória Mínima dos extratos de <i>Ficus pumila</i> . .....	26
Figura 4: Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos de <i>Ficus pumila</i> . ...	27



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frequências percentuais, frequências cumulativas e tamanho médio das partículas na análise granulométrica das folhas de <i>Ficus pumila</i> .....	30
Tabela 2: Resultados obtidos na triagem fitoquímica dos extratos de <i>Ficus pumila</i> .	31
Tabela 3: Teor de compostos fenólicos totais (mg AG/g amostra) dos extratos de <i>Ficus pumila</i> .	32
Tabela 4: Teor de flavonoides totais (mg quercetina/g amostra) dos extratos de <i>Ficus pumila</i> .....	33
Tabela 5: Resultados da avaliação microbiológica dos extratos de <i>Ficus pumila</i> . Diâmetro dos halos medidos em milímetros (mm).	35
Tabela 6: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos de <i>Ficus pumila</i> . Resultados expressos em mg/mL.	37
Tabela 7: Atividade antioxidante dos extratos etanólicos de <i>Ficus pumila</i> .....	40
Tabela 8: Resultados dos testes realizados para os extratos de <i>Ficus pumila</i> .	44

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1	PRODUTOS NATURAIS .....	13
2.2	ANTIMICROBIANOS A PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS .....	15
2.3	FAMÍLIA MORACEAE .....	16
2.4	ESTUDOS SOBRE A FAMÍLIA MORACEAE E <i>Ficus pumila</i> .....	17
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
3.1	OBJETIVO GERAL.....	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
4.1	OBTENÇÃO E CADASTRAMENTO DA PLANTA.....	20
4.2	PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS .....	20
<b>4.2.1</b>	<b>Extratos da planta fresca</b> .....	20
<b>4.2.2</b>	<b>Extratos da planta seca</b> .....	21
4.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE <i>Ficus pumila</i> .....	22
<b>4.3.1</b>	<b>Triagem fitoquímica dos extratos</b> .....	22
<b>4.3.2</b>	<b>Determinação do teor de compostos fenólicos totais</b> .....	22
<b>4.3.3</b>	<b>Determinação do teor de flavonoides</b> .....	23
4.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS DE <i>Ficus pumila</i> .....	23
<b>4.4.1</b>	<b>Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos</b> .....	23
4.4.1.1	Avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos .....	25
4.4.1.2	Avaliação da concentração microbicida mínima dos extratos .....	26
<b>4.4.2</b>	<b>Avaliação da atividade antioxidante (sequestro de radical livre DPPH)</b> .	27
4.5	ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE À CULTURA CELULAR.....	28
4.6	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA .....	29
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
5.1	ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DOS PÓS .....	30
5.2	TRIAGEM FITOQUÍMICA, COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES .	31
5.3	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS DE <i>Ficus pumila</i> .....	34
<b>5.3.1</b>	<b>Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos</b> .....	34
<b>5.3.2</b>	<b>Avaliação da atividade antioxidante (sequestro de radical livre DPPH)</b> .	39

5.4	ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE À CULTURA CELULAR.....	41
5.5	RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS.....	43
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>45</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No decorrer das últimas décadas, o desenvolvimento de fármacos eficientes no combate a infecções microbianas revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução drástica da mortalidade causada por essas doenças. Por outro lado, a disseminação do uso de antibióticos lamentavelmente fez com que os microrganismos também desenvolvessem resistência aos agentes antimicrobianos, inclusive às drogas utilizadas no tratamento da tuberculose (SILVEIRA et al., 2006).

A resistência é considerada grande problema mundial de saúde pública, pois impõe limitações às opções para o tratamento de infecções. Assim, o aumento de cepas multirresistentes aos fármacos antimicrobianos disponíveis no mercado tornou importante a busca por novos agentes antimicrobianos (OPLUSTIL, 2012).

Os produtos naturais, principalmente de origem vegetal, constituem uma excelente fonte para a busca de novas drogas antimicrobianas, pois, apresentam uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos. Por muito tempo, inúmeras plantas têm sido utilizadas no tratamento das mais diversas enfermidades. Desse modo, pesquisas voltadas para o estudo e avaliação de plantas utilizadas na terapêutica devem ser estimuladas com o objetivo de produzir novos fármacos, principalmente com atividade antimicrobiana (NOVAIS et al., 2003).

*Ficus pumila* L., conhecida como hera-miúda ou unha-de-gato, é uma planta da família Moraceae, nativa do Japão, China e Austrália, que tem sido amplamente utilizada na medicina tradicional chinesa. Embora apresente diversas atividades biológicas, ainda são poucos os relatos de sua atividade antioxidante e antimicrobiana na literatura (LORENZI; HERMES, 2001; LIAO et al., 2012). Nesse contexto, este trabalho teve como alvo a investigação da composição química e das atividades antimicrobiana e antioxidante de extratos hidroetanólicos de caule, raiz, folhas e frutos secos e frescos de *F. pumila* para possível uso no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, Micobactérias e leveduras.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PRODUTOS NATURAIS

O Brasil é um país de grande extensão territorial caracterizado principalmente por sua rica biodiversidade, não podendo abdicar de sua vocação para o uso de produtos naturais na terapêutica medicinal (PINTO et al., 2002 e HALBERSTEIN, 2005). Diante da escassez de remédios empregados na Europa, no período da colonização, médicos portugueses perceberam a importância dos produtos medicinais utilizados pelos indígenas (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Até o século passado, a maior parte dos medicamentos era obtida a partir de vegetais ou animais. Com a revolução industrial e o desenvolvimento da química orgânica surgiram os medicamentos sintéticos, considerados mais ativos e seguros (RATES, 2001).

No entanto, parcela significativa da população ainda tem preferência pelo tratamento à base de plantas medicinais e fitoterápicos, movimentando um mercado altamente lucrativo. Países como Brasil, Argentina e México desempenham um importante papel no mercado de plantas medicinais (SAHOO; MANCHIKANTI; DEY, 2010). Além disso, boa parte das drogas prescritas no mundo é de origem vegetal, incluindo as drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (RATES, 2001).

As plantas medicinais, muitas vezes, representam o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. A utilização de plantas no tratamento e cura de doenças é tão antigo quanto a civilização humana. Em várias regiões do Brasil, ainda hoje, muitas plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e cultivadas em quintais (MACIEL et al., 2002).

Devido à facilidade de acesso, baixo custo e compatibilidade cultural, a utilização de plantas medicinais, na forma de chás, pós, gotas, cápsulas e outros, vêm crescendo substancialmente nos últimos anos. Apesar da evolução na medicina, muitas populações carentes ainda enfrentam obstáculos, como o acesso aos centros de atendimento hospitalares e a obtenção de exames e medicamentos. Isto, associado à fácil obtenção e a tradição do uso de plantas medicinais, contribui

para o emprego de plantas no tratamento de diversas doenças (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

As plantas com propriedades terapêuticas representam uma importante fonte de novas moléculas biologicamente ativas. Utilizadas ao longo de décadas como parte do cuidado tradicional de saúde em todo o mundo, essas plantas têm despertado o interesse de vários pesquisadores (BELÉM, 2002; MICHELIN et al., 2005; FONTENELLE et al., 2007).

Muitos produtos naturais têm apresentado interessantes atividades biológicas e farmacológicas (VERPOORTE, 2000). A maior parte das substâncias orgânicas conhecidas atualmente é de origem natural, principalmente do reino vegetal. Além de serem utilizadas no tratamento de uma ampla gama de enfermidades, as plantas também são reconhecidas por sua capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários, contribuindo de forma significativa para o fornecimento de substâncias utilizadas como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (CRAGG et al., 1999 e PINTO et al., 2002).

Em 1976, na cidade do Vaticano, foi realizada a semana de estudos “Produtos Naturais e a Proteção de Plantas”, onde se discutiu o papel de determinados metabólitos secundários na defesa de plantas contra predadores. As plantas possuem suas próprias defesas contra vírus, bactérias, fungos, outras plantas, insetos e herbívoros. Estas defesas normalmente envolvem metabólitos secundários como terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (PINTO et al., 2002).

Estes metabólitos são produzidos pelas plantas para diferentes propósitos como regulação do crescimento, proteção contra radiação ultravioleta (UV) e defesa contra predadores e infecções (VERPOORTE, 1998, WILLS; BONE; MORGAN, 2000; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Atualmente, muitas dessas substâncias têm servido como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos, fato que justifica a busca por novas substâncias bioativas, principalmente nas florestas tropicais do Brasil, onde se concentra uma grande variedade de espécies sem qualquer estudo químico ou biológico (PINTO et al., 2002)

## 2.2 ANTIMICROBIANOS A PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS

Antimicrobianos ou antibióticos são substâncias sintéticas ou naturais capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de agentes microbianos como fungos e bactérias. Geralmente são obtidos a partir de substâncias produzidas pelos próprios microrganismos e substâncias de origem vegetal ou sintética (TRABULSI et al., 2005 e GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A descoberta dos antibióticos foi um grande avanço para a aplicação terapêutica tanto na medicina humana quanto na veterinária. Esses agentes são importantes no combate de doenças infecciosas (SOUSA, 2006). As infecções, principalmente as que ocorrem em ambiente hospitalar, representam um importante problema de saúde pública mundial, pois favorecem o aumento da morbidade, da mortalidade e do tempo de internação dos pacientes, além de causar alterações nos padrões de resistência microbiana, elevando os custos assistenciais (SOUSA et al., 2012).

A resistência às drogas antimicrobianas constitui um dos maiores problemas da medicina, pois é causada pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural dando vantagens aos mais aptos (SOUZA, 1998; ARIAS; CARRILHO, 2012).

Em ambientes hospitalares é possível encontrar bactérias resistentes a todas as classes existentes de antimicrobianos, mostrando o grande potencial de adaptação evolucionária destes microrganismos (RAHAL; URBAN; SEGAL-MAURER, 2002). O aumento do número de microrganismos com elevado perfil de resistência aos antibióticos constitui um fator preocupante, reforçando a necessidade pela busca por alternativas terapêuticas, como por exemplo, a pesquisa de novos agentes antimicrobianos a partir de espécies vegetais (ROGUES et al., 2007).

Em função da grande diversidade, fácil obtenção e baixo custo de produtos de origem vegetal, vários países têm investido em pesquisas para a obtenção de substâncias antimicrobianas a partir de plantas medicinais. Um exemplo é a *Erythrina velutina* (suinã), uma planta medicinal do nordeste brasileiro que apresentou atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Além dela, outras plantas como *Croton argyrophylloides* (marmeleiro prateado), *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) e *Struthanthus vulgaris* (erva-de-

passarinho) também demonstraram atividade antimicrobiana (BERTINI; PEREIRA; OLIVEIRA, 2005 e SILVEIRA et al., 2009).

Terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos estão entre as principais substâncias com propriedades antimicrobianas extraídas de plantas (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

### 2.3 FAMÍLIA MORACEAE

Moraceae é uma família de plantas composta por árvores e arbustos, monoicos ou dioicos, com folhagem caduca ou persistente. As plantas dessa família, com poucas exceções, geralmente possuem látex e folhas inteiras dispostas alternadamente e raramente opostas. Apresentam flores muito pequenas de sexos separados, reunidas em densas inflorescências protegidas por elementos do perianto (JOLY, 1977; LAWRENCE, 1951).

A família Moraceae é composta por aproximadamente 70 gêneros e mais de 1000 espécies com distribuição predominantemente tropical e subtropical. No Brasil é possível encontrar 27 gêneros e cerca de 250 espécies, principalmente na Região Amazônica (SOUZA; LORENZI, 2005; LAWRENCE, 1951).

Geralmente, as flores masculinas se caracterizam por estames opostos em mesmo número que os elementos do perianto, filetes livres e anteras biloculares. Já as flores femininas se apresentam com ou sem perianto e possuem um pistilo, ovário súpero e ínfero dicarpelar e unilocular, um óvulo e dois estigmas e dois estiletos (SOUZA; LORENZI, 2005; LAWRENCE, 1951).

Os vegetais pertencentes à família Moraceae apresentam fruto do tipo drupa ou aquênio, muitas vezes formando enorme infrutescência, resultante da fusão dos frutos com o perianto e eixos florais. As sementes geralmente possuem endosperma e embrião curvo (LAWRENCE, 1951).

Dentre as espécies de maior importância econômica estão a amora (*Morus* spp.), o figo (*Ficus carica*), a fruta-pão (*Artocarpus altilis*) e a jaca (*Artocarpus heterophyllus*) (SOUZA; LORENZI, 2005).

Com cerca de 750 espécies, o gênero *Ficus* compreende um dos mais comuns da família Moraceae. A maior parte das espécies desse gênero é



hemiepífita, emitindo raízes que, no solo, tornam-se espessas e sufocam a árvore hospedeira (SOUZA; LORENZI, 2005).

As plantas do gênero *Ficus* apresentam inflorescência do tipo sicônio e fruto do tipo aquênio. Em certas espécies, a polinização é realizada por insetos cujo ciclo biológico é adaptado à produção de vários tipos de inflorescência pela planta (JOLY, 1977; ELIAS et al., 2007).

O gênero *Ficus* possui espécies conhecidas como figueira, figueira-branca, gameleira da mata, mata-pau e a conhecida hera miúda que reveste paredes. Algumas espécies de *Ficus*, como a *F. carica* (figo), possuem importância econômica já que seus frutos são utilizados como alimento (JOLY, 1977). Outras, como a *Ficus pumila* (unha-de-gato), apesar de suas raízes causarem danos às construções, são usadas na ornamentação (SOUZA; LORENZI, 2005).

*Ficus pumila* L. (Figura 1) é uma planta nativa do Japão, China e Austrália, largamente difundida por todo o mundo devido ao seu aspecto ornamental. Popularmente conhecida como unha-de-gato ou hera-miúda, *F. pumila* é uma planta de crescimento rápido, amplamente utilizada em ornamentação de muros, colunas e paredes, onde se fixa fortemente por meio de suas raízes adventícias (LORENZI; HERMES, 2001).



Figura 1: Aspecto geral de *Ficus pumila*.

Fonte: O autor.

#### 2.4 ESTUDOS SOBRE A FAMÍLIA MORACEAE E *Ficus pumila*

Muitos são os estudos que relatam as atividades biológicas de plantas da família Moraceae. A *Morus nigra* L. (amoreira-preta), por exemplo, possui atividade

antioxidante, hipoglicemiante, anti-inflamatória e antimicrobiana (PADILHA et al., 2010). Outro exemplo do gênero *Morus* é a *Morus alba* L. (amoreira branca), que mostrou moderada atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (PEREIRA et al., 2012). De acordo com Toshio, Kiyoshi e Sumio (2005), a chalcomoracina, uma substância isolada de espécies de *Morus*, apresentou considerável atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina.

Também existem relatos sobre a atividade antimicrobiana do gênero *Artocarpus*. Segundo Cavalcante et al. (2013), o extrato hidroalcoólico da folha de *Artocarpus heterophyllus* L., conhecida popularmente como Jaqueira, exibiu atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pneumoniae*.

Já em relação ao gênero *Ficus*, diversos trabalhos confirmam a ação antimicrobiana de extratos de *Ficus sycomorus*, *F. benghalensis*, *F. religiosa*, *F. racemosa* e *F. benjamina*. Em seu trabalho, Reschke, Marques e Mayworm (2007) descreve a atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *F. benjamina* (figueira-benjamins) contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Proteus mirabilis*. De acordo com estudos fitoquímicos as espécies do gênero *Ficus* apresentam em sua composição cumarinas, flavonoides, terpenoides, alcaloides e taninos, possivelmente relacionados à suas atividades biológicas (RESCHKE; MARQUES; MAYWORM, 2007).

Quanto à espécie *F. pumila*, ainda são poucos os estudos em relação à suas atividades biológicas. No entanto, sabe-se que na medicina tradicional chinesa, essa planta é amplamente utilizada como medicamento antitumoral, antiinflamatório e tônico, assim como para tratar doenças como diabetes e hipertensão. Além disso, o extrato etanólico das folhas de *Ficus pumila* tem demonstrado uma significativa atividade anti úlcera (MUHAMMED ASHRAF et al., 2012). Essas atividades podem estar possivelmente relacionadas à presença de compostos como esteroides e triterpenoides em seus frutos e de flavonóides, esteroides e triterpenos em suas folhas. (KITAJIMA; KIMIZUKA; TANAKA, 2000; LIAO et al., 2012, LEONG et al., 2008; KITAJIMA et al., 1998).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a análise fitoquímica e avaliar a atividade biológica de extratos hidroetanólicos da raiz, caule, folha e fruto secos e frescos de *Ficus pumila*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar triagem fitoquímica e avaliar os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais dos extratos hidroetanólicos de diferentes órgãos de *Ficus pumila*.

- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos de *Ficus pumila*.

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos hidroetanólicos de *Ficus pumila* frente aos seguintes microrganismos: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterobacter cloacae* (LMI-UNIFAL), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Proteus mirabilis* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Serratia marcescens* (LMI-UNIFAL), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Mycobacterium bovis* (cepa BCG) ATCC 27289, *Mycobacterium tuberculosis* (H37) ATCC 27294, *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Sacharomyces cerevisiae* (ATCC 2601).

- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos hidroetanólicos de *Ficus pumila* frente à cultura celular BHK-21 (células de rim de hamster neonato).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO E DEPÓSITO DA EXSICATA

As amostras da raiz, caule, folha e fruto de *Ficus pumila* foram coletadas no bairro Jardim Aeroporto, localizado no município de Alfenas-MG (21° 27' 50.70" S e 45° 55' 33.48" O) a uma altitude de 908m, em novembro de 2012.

Após a coleta, amostras da planta foram herborizadas e depositadas no Herbário UALF da Universidade Federal de Alfenas, recebendo o número de registro 2339.

### 4.2 PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Após a coleta das amostras da raiz, caule, folha e fruto de *Ficus pumila*, foram preparados extratos hidroetanólicos da planta fresca e seca, com o propósito de comparar os dois métodos de extração.

Os extratos foram preparados nos laboratórios de Microbiologia e Imunologia e de Fitoquímica e Química Medicinal da Universidade Federal de Alfenas.

#### 4.2.1 Extratos da planta fresca

Para a obtenção dos extratos da planta fresca, as amostras da raiz, caule, folha e fruto de *Ficus pumila* foram lavados em água corrente e em seguida, cortados manualmente em pedaços menores com o auxílio de uma faca.

Os extratos hidroetanólicos da planta fresca foram preparados na proporção de 20% (m/v) utilizando álcool etílico a 70% (v/v) e macerados por sete dias ao abrigo da luz, com agitação diária.

Após maceração, os extratos foram filtrados em filtro de “nylon” e em seguida, em filtro de papel. Posteriormente, foram submetidos à concentração em rotaevaporador à pressão negativa de 500 mmHg e temperatura igual a 60 °C.

Os extratos rotaevaporados foram distribuídos em frascos de 5 mL, congelados e liofilizados. Antes da liofilização, os frascos foram pesados para a determinação do rendimento.

#### **4.2.2 Extratos da planta seca**

No preparo dos extratos da planta seca, as amostras da raiz, caule, folhas e frutos de *Ficus pumila* foram lavados em água corrente, cortados manualmente em pedaços menores com o auxílio de uma faca e em seguida, desidratadas a temperatura de 37°C em estufa até a obtenção do peso constante.

Posteriormente, a planta desidratada foi triturada e submetida à granulometria para determinação do tamanho médio da partícula para extração. A granulometria foi estabelecida de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5° Ed. (2010), utilizando Agitador de Peneiras – Eletromagnético (ErTel®) com conjunto de tamises com malhas variando de 250 a 850 µm sob a vibração pré-estabelecida anteriormente por um período de 15 minutos. Os pós obtidos da raiz, caule, folha e fruto foram submetidos, separadamente, a remaceração (maceração por quatro vezes) na proporção de 20% (m/v) utilizando álcool etílico a 70% (v/v).

Após cada remaceração, o extrato foi filtrado em filtro de “nylon” e em seguida, em filtro de papel. Posteriormente, o filtrado obtido foi submetido à concentração em rotaevaporador à pressão negativa de 500 mmHg e 60 °C.

Os extratos rotaevaporados foram distribuídos em frascos de 5 mL e em seguida, pesados para determinação do rendimento. Posteriormente, os extratos foram congelados e liofilizados.

### 4.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE *Ficus pumila*

#### 4.3.1 Triagem fitoquímica dos extratos

Os extratos hidroetanólicos da raiz, caule, folhas e frutos de *Ficus pumila* foram submetidos a testes fitoquímicos baseados em técnicas colorimétricas e de precipitação para detecção dos principais constituintes bioativos: antraquinonas, flavonoides, taninos, saponinas e alcaloides.

Para antraquinonas, foi usada a reação Bornträger direta. Para taninos, foram utilizados os métodos de precipitação com sais de ferro, acetato de chumbo, alcaloides, gelatina e acetato de cobre. Para flavonoides, foram usadas as reações de cloreto de alumínio e Shinoda que apresentam cor específica quando há a presença destes compostos. As saponinas foram identificadas pela agitação do extrato aquoso com formação de espuma persistente. Os alcaloides foram detectados pelo método de precipitação, usando os reativos de Bertrand, Bouchardat, Dragendorf e Mayer (COSTA, 1994; WHO, 1998).

#### 4.3.2 Determinação do teores de compostos fenólicos totais

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais, uma alíquota de cada um dos extratos (0,5 mL) preparados a 0,1 mg/mL foi misturada com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído em água destilada 1:10) e 2,0 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4% (m/v) em água destilada. Após 2 h de incubação ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 750 nm.

Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg AG/g), calculados por meio de uma curva construída com concentrações que variaram de 5 a 100 µg/mL de uma solução padrão de ácido gálico (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999).

### 4.3.3 Determinação do teores de flavonoides totais

Os teores de flavonoides totais foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Kalia et al. (2008). Uma alíquota de 0,5 mL dos extratos (na concentração de 1,5 mg/ mL) foi misturada com 1,5 mL de etanol, 0,1 mL de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 10% (m/v), 0,1 mL de acetato de potássio 1 M e 2,8 mL de água destilada, totalizando 5 mL de reação.

Após 30 minutos, a absorbância da mistura foi medida a 425 nm. A curva padrão para flavonoides totais foi feita usando uma solução padrão de quercetina. Os teores de flavonoides totais foram expressos como miligramas de equivalentes de quercetina por grama de amostra (mg quercetina/g), e os valores foram apresentados como média das análises em triplicata (KALIA et al., 2008).

## 4.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS DE *Ficus pumila*

### 4.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os testes microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos, foram utilizados os seguintes microrganismos:

- a) Treze amostras de bactéria: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterobacter aerogenes* (LMI-UNIFAL), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Proteus mirabilis* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Serratia marcescens* (LMI-UNIFAL), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Mycobacterium bovis* (cepa BCG) ATCC 27289 e *Mycobacterium tuberculosis* (H37) ATCC 27294.

- b) Duas amostras de fungos: *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Sacharomyces cerevisiae* (ATCC 2601).

A ação antimicrobiana foi determinada pelo método da difusão em ágar segundo metodologia proposta no documento M7-A6 (CLSI, 2003) para bactérias e M44-A2 (CLSI, 2009) para fungos com algumas modificações proposta por Silva et al, (2010).

Para a avaliação da atividade antimicrobiana utilizou-se Ágar Mueller Hinton para as bactérias e Ágar Mueller Hinton adicionado de 2% de glicose para as leveduras. As suspensões de microrganismos foram preparadas em soro fisiológico com turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de Mac Farland. Os extratos liofilizados foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) na concentração de 50 mg/mL e em seguida, esterilizados por filtração em membrana Millipore com 0,45 µm.

Com auxílio de um tubo metálico foram perfurados poços de 4 mm de diâmetro na superfície do meio de cultura para a aplicação dos extratos a serem testados. Em seguida, a suspensão de microrganismo foi inoculada na superfície do meio e cada poço foi preenchido com 40µL (2 mg) de extrato. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, realizou-se a leitura dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano, utilizando como controle positivo de ação antimicrobiana solução de clorexidina a 0,12% (v/v) e como controle negativo, água destilada. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e submetidos aos testes de determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

A atividade sobre *Mycobacterium bovis* (BCG) e *Mycobacterium tuberculosis* (H37) foi determinada pela técnica de difusão em meio Agar Middlebrook 7H10 adicionado de Middlebrook OADC Enrichment®. Um volume de 10 µL de cada extrato preparado na concentração de 50 mg/mL foi colocado em discos de papel de filtro de 10 mm de diâmetro. Após a adição do extrato, os discos foram secos a 37°C em estufa. O Agar Middlebrook 7H10 foi inoculado com uma suspensão de *M. bovis* e *M. tuberculosis* (H37) com turvação correspondente ao tubo 2.0 da Escala de Mac Farland, homogeneizada com auxílio de pérolas de vidro para desagregação das colônias. Foi utilizado como controle positivo solução de Rifampicina 50 µg e como controle negativo, água destilada (Figura 2). As culturas foram incubadas a 37°C por 28 dias.





Figura 2: Teste de difusão para micobactérias. Controle positivo à esquerda (Rifampicina) e negativo à direita (água destilada).

#### 4.4.1.1 Avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, conforme metodologia proposta no documento M27-A3 (CLSI, 2008).

Para as bactérias utilizou-se Caldo Mueller Hinton e para as leveduras, Caldo Mueller Hinton adicionado de 2% de glicose. As suspensões de microrganismos foram preparadas em soro fisiológico com turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de Mac Farland. Os extratos liofilizados foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) na concentração de 50 mg/mL e em seguida, filtrados em membrana Millipore (0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro).

O ensaio foi realizado em microplacas de fundo chato contendo 96 poços, distribuídos em oito linhas (A - H) e 12 colunas (1 - 8) (Figura 3). Um volume de 100  $\mu\text{L}$  de Caldo Mueller Hinton duas vezes concentrado foi adicionada em cada poço da coluna 1. Os poços das colunas restantes receberam 100  $\mu\text{L}$  de Caldo Mueller Hinton.

Em uma segunda etapa, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do extrato da planta em cada poço da coluna 1 e realizou-se a diluição do extrato a partir da concentração de 25 mg/mL até 0,05 mg/mL. Na diluição, 100  $\mu\text{L}$  da mistura contida em cada poço da coluna 1 foi transferida para a coluna 2 e homogeneizado. Esse processo foi

repetido até a coluna 10 da microplaca, na qual após a homogeneização, foram desprezados 100  $\mu$ L da mistura.

Posteriormente, foi adicionado um volume de 10  $\mu$ L da suspensão de microrganismo em cada poço das colunas 1 a 11, partindo da linha B até a H. A coluna 11 foi utilizada como controle de crescimento do microrganismo e a coluna 12 como controle de esterilidade do meio. A linha A foi usada como controle de esterilidade e da turvação do extrato.

Após a adição do microrganismo, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, foi realizada a leitura visual das placas através observação da inibição ou crescimento bacteriano pela turvação do meio de cultura. Em seguida, foram adicionados 15  $\mu$ L do corante Resazurina (0,01% m/v) com o objetivo de identificar os poços com crescimento bacteriano. Considerou-se a ausência de bactérias viáveis nos poços onde não houve mudança de cor do corante. A análise foi realizada em triplicata.

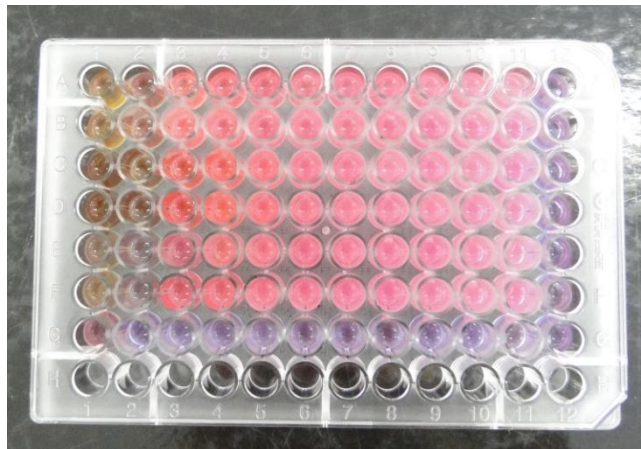


Figura 3: Concentração Inibitória Mínima dos extratos de *Ficus pumila*.

#### 4.4.1.2 Avaliação da concentração microbicida mínima dos extratos

A determinação da concentração microbicida mínima (CMM) dos extratos foi realizada com base nos resultados da CIM, utilizando-se placas contendo ágar nutriente estéril (Figura 4). No ensaio, um volume de 10  $\mu$ L de suspensão proveniente de cada poço da microplaca da CIM foi inoculado na superfície do Ágar

Nutriente. Para as leveduras foi utilizado o Agar Sabouraud. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após a incubação, a CMM foi considerada a menor concentração na qual não houve crescimento visível do microrganismo no ágar.

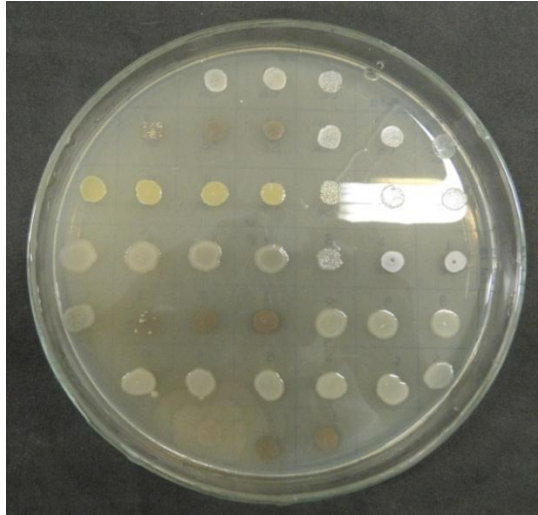


Figura 4: Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos de *Ficus pumila*.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para todos os extratos frente a todos os microrganismos, com exceção das micobactérias, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração microbicida mínima (CMM).

#### 4.4.2 Avaliação da atividade antioxidante (sequestro de radical livre DPPH)

A propriedade dos extratos etanólicos de *Ficus pumila* de sequestrar radicais livres DPPH foi avaliada de acordo com o método descrito por Yen et al. 2005. Diferentes concentrações dos extratos (entre 400 e 1,56 µg/mL, em diluição seriada de razão 2) em uma solução etanólica (2 mL) foram misturadas com 0,5 mL de DPPH (0,5 mM, diluído em etanol). Depois da incubação por 30 min, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, a absorbância foi medida em 517 nm. O branco foi composto por todos os reagentes, exceto os extratos. Ácido ascórbico, quercetina e BHT foram utilizados como controle positivo. A propriedade de sequestro foi

calculada em porcentagem de radicais DPPH sequestrados, usando a seguinte equação:

Sequestro de radical DPPH (%) = [(absorbância do branco – absorbância da amostra) / (absorbância branco)] x 100.

Os valores foram apresentados como média das análises em triplicata. O valor  $EC_{50}$  é a concentração efetiva que pode sequestrar 50% dos radicais DPPH da solução. O valor DPPH remanescente refere-se à porcentagem de DPPH restante na solução, após a ação da amostra (=100 - porcentagem de sequestro).

#### 4.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE À CULTURA CELULAR

A citotoxicidade foi avaliada através do método que se baseia na medida da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial que, quando ativa, é capaz de metabolizar o reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) em um composto colorido denominado formazan.

Neste ensaio foram semeadas  $1 \times 10^4$  de células BHK-21 (células de rim de hamster neonato) por poço, em placas de 96 poços contendo meio de cultura MEM (Meio Mínimo Essencial de Eagle), acrescido de 10% de soro fetal bovino e antibióticos. Após 24 h de incubação a temperatura ambiente, o meio de cultivo foi removido e adicionado à cultura, 0,1 mL de meio MEM contendo 1% de soro fetal bovino com diluições decrescentes dos extratos (5mg/mL a 0,039 mg/mL).

As microplacas foram incubadas a temperatura ambiente por 48h. Após esse período foi acrescentado 10  $\mu$ L de MTT a uma concentração de 5mg/mL e incubou-se por 4 h a temperatura ambiente para a incorporação do MTT e formação dos cristais de formazan. Posteriormente foi removido cuidadosamente o meio de cultura e solubilizado os cristais de formazan pela adição de 100  $\mu$ L de dimetil sulfóxido (DMSO). A análise espectrofotométrica foi realizada em um leitor de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. A porcentagem de citotoxicidade foi calculada utilizando a fórmula [(A-B) / Ax100], onde A e B são valores das densidades ópticas das células controle e tratadas, respectivamente. A concentração citotóxica para 50% das células ( $CC_{50}$ ) foi estimada a partir de curvas de concentração-efeito após

análise de regressão linear (ARAÚJO et al., 2008). Os testes foram realizados em duplicata juntamente com o controle da viabilidade celular.

#### 4.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

A avaliação estatística dos resultados da atividade antioxidante e dos teores de flavonoides totais e compostos fenólicos totais foi realizada por meio do *software* SISVAR 5,3, pela análise de variância (ANAVA) e aplicado o Teste de Scott-Knott para observar as diferenças significativas entre os valores médios ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DOS PÓS

A avaliação granulométrica constitui um importante parâmetro, uma vez que influencia diretamente sobre o processo extrativo e, conseqüentemente, no teor de compostos ativos presentes no extrato obtido (MIGLIATO et al., 2007).

A avaliação granulométrica dos pós das folhas, caule, raiz e fruto de *Ficus pumila* foram realizados segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª edição. Os resultados da análise são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Frequências percentuais, frequências cumulativas e tamanho médio das partículas na análise granulométrica das folhas de *Ficus pumila*.

<b>Órgão vegetal</b>	<b>Tamanho médio das partículas</b>
Folha	183,15
Raiz	184,73
Caule	214,47
Fruto	185,91

De acordo com os resultados obtidos e com a Farmacopeia Brasileira 5ª ed., os pós das folhas, caule, raiz e fruto de *F. pumila* são classificados como pós moderadamente grossos, isto é, pós cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 710 µm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250 µm.

Outro aspecto observado foi a diferença de diâmetro entre os pós de *Ficus pumila* analisados, sugerindo que diferenças anatômicas entre os órgãos vegetais podem provocar alterações na eficiência do processo de moagem e, conseqüentemente, no grau de redução das partículas (BARNI et al., 2009).

## 5.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA E TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS

A triagem fitoquímica dos extratos hidroetanólicos da raiz, caule, folhas e frutos de *Ficus pumila* evidenciou a presença de flavonoides e taninos em todos os extratos, tanto obtidos a partir da planta fresca quanto a partir da planta seca.

A Tabela 2 exibe os resultados para a triagem fitoquímica dos extratos.

Tabela 2: Resultados obtidos na triagem fitoquímica dos extratos de *Ficus pumila*.

EXTRATOS/Grupos	Antraquinonas	Alcaloides	Saponinas	Flavonoides	Taninos
Folha fresca	-	-	-	+	+
Folha seca	-	-	-	+	+
Caule fresco	-	-	-	+	+
Caule seco	-	-	-	+	+
Raiz fresca	-	-	-	+	+
Raiz seca	-	-	-	+	+
Fruto fresco	-	-	-	+	+
Fruto seco	-	-	-	+	+

Espécies do gênero *Ficus* geralmente apresentam flavonoides, alcaloides, ácidos fenólicos, esteroides, saponinas, cumarinas, taninos e triterpenoides (SIRISHA et al., 2010). No entanto, a composição de metabólitos secundários de uma planta pode ser influenciada por fatores como altitude, sazonalidade e idade da planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Estudos realizados por Pistelli; Chiellini; Morelli (2000) e Leong et al. (2008) indicaram a presença de flavonoides em extratos obtidos a partir da folha e do caule de *F. pumila*. Já a presença de taninos em extrato metanólico das folhas de *F. pumila* foi citada no trabalho desenvolvido por Kaur (2012). Desse modo, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os relatos referentes à composição química da *Ficus pumila* encontrados na literatura.

O teor de compostos fenólicos variou de 84,8 a 724,39 mg AG/g. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3: Teor de compostos fenólicos totais (mg AG/g amostra) dos extratos de *Ficus pumila*.

Amostra – Extratos Etanólicos	Teor de Compostos Fenólicos Totais* (mg AG/g)**
Folha fresca	153,21 ± 8,4 <sup>f</sup>
Folha seca	154,29 ± 3,5 <sup>f</sup>
Caule fresco	84,8 ± 3,3 <sup>g</sup>
Caule seco	492,57 ± 7,9 <sup>b</sup>
Raiz fresca	370,24 ± 11,7 <sup>d</sup>
Raiz seca	724,39 ± 27,7 <sup>a</sup>
Fruto fresco	298,08 ± 6,6 <sup>e</sup>
Fruto seco	407,26 ± 19,1 <sup>c</sup>

\* Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Scott-Knott p<0,05).

\*\* Miligramas de ácido gálico por grama de amostra.

De acordo com os dados da Tabela 3 é possível verificar que houve uma maior recuperação de compostos fenólicos nos extratos preparados a partir da planta seca. O maior teor de compostos fenólicos totais foi apresentado pela raiz seca (724,39 mg AG/g), seguido pelo caule seco (492,57 mg AG/g). Já o menor teor de compostos fenólicos foi exibido pelo caule fresco (84,8 mg AG/g).

Ao contrário dos compostos fenólicos, a dosagem de flavonoides demonstrou que o processo de extração utilizando a planta fresca foi mais eficiente para a recuperação de flavonoides. O teor de flavonoides para os extratos de *Ficus pumila* variou de 1,29 a 15,30 mg quercetina/g. A Tabela 4 mostra os resultados.



Tabela 4: Teor de flavonoides totais (mg quercetina/g amostra) dos extratos de *Ficus pumila*.

Amostra / Extratos Etanólicos	Teor de Flavonoides Totais* (mg quercetina/g)**
Folha fresca	9,38 ± 0,1 <sup>b</sup>
Folha seca	15,30 ± 0,6 <sup>a</sup>
Caule fresco	2,56 ± 0,2 <sup>d</sup>
Caule seco	1,29 ± 0,1 <sup>e</sup>
Raiz fresca	2,71 ± 0,1 <sup>d</sup>
Raiz seca	1,63 ± 0,1 <sup>e</sup>
Fruto fresco	5,70 ± 0,4 <sup>c</sup>
Fruto seco	3,05 ± 0,1 <sup>d</sup>

\* Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Scott-Knott p<0,05).

\*\* Miligramas de quercetina por grama de amostra.

Com base nos os dados da Tabela 4, o maior teor de flavonoides totais foi apresentado pela folha seca (15,30 mg quercetina/g) e o menor teor foi verificado no caule seco (1,29 mg quercetina/g).

Não foram encontrados na literatura dados referentes ao teor de compostos fenólicos e flavonoides totais de extratos de *Ficus pumila* para comparação.

A presença de fenólicos, como taninos e flavonoides nas plantas pode ser relacionado a inúmeras atividades biológicas, como a atividade antioxidante e a atividade antimicrobiana (EINBOND et al., 2004; BANERJEE; DASGUPTA; DE, 2005; CHOI et al., 2006). A atividade antimicrobiana de compostos fenólicos e flavonoides se deve ao fato desses compostos serem capazes de reagir com o DNA e interferir na sua replicação, inibindo o crescimento bacteriano. (MALEKI et al., 2008; SEYYEDNEJAD et al., 2008).

Os taninos são compostos fenólicos presentes na maior parte das plantas, capazes de formar complexos que inativam enzimas utilizadas por fitopatógenos (MONTEIRO et al., 2005; KAMBA e HASSAN, 2010). Sua atividade antimicrobiana ocorre em função de três características gerais desse grupo: atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres, complexação com íons metálicos e complexação com moléculas como proteínas e polissacarídeos (MELLO e SANTOS, 2001).

### 5.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS DE *Ficus pumila*

#### 5.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos foi realizada pelo teste de difusão em ágar, um método físico no qual se avalia a sensibilidade de um microrganismo frente a uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido, relacionando o tamanho do halo no qual houve inibição de crescimento do microrganismo com a concentração da substância testada (OSTROSKY et al., 2008). O diâmetro do halo de inibição de crescimento microbiano é mensurado em milímetros e está relacionado à sensibilidade do microrganismo e a velocidade de difusão do antimicrobiano no ágar (BRASIL, 2013).

Neste trabalho, o teste de difusão em ágar demonstrou a sensibilidade dos seguintes microrganismos aos extratos de *Ficus pumila* testados: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis*. Dentre esses microrganismos, o *Micrococcus luteus* foi a bactéria mais sensível, apresentando halos de 10 a 16 mm, exceto para o extrato da folha seca, que não apresentou halo de inibição. Já o *Bacillus cereus* se mostrou sensível a todos os extratos testados, com halos de 6 a 14 mm. Não foi observada a inibição de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* e leveduras pelos extratos.

De acordo com os resultados do teste de difusão em ágar, foi possível verificar diferenças quanto ao espectro de ação e o diâmetro dos halos de inibição entre os extratos preparados com a planta seca e com a planta fresca. O extrato de folha seca exibiu maior espectro de ação que o extrato de folha fresca, além disso, apresentou maiores halos de inibição. O mesmo foi observado para os extratos de caule seco, raiz seca e fruto seco, quando comparados aos respectivos extratos preparados com a planta fresca.

Os melhores resultados quanto ao espectro de ação e o diâmetro dos halos de inibição foram exibidos pelo extrato de raiz seca, seguido pelo extrato de caule seco. Os resultados para o teste de difusão em ágar são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados da avaliação microbiológica dos extratos de *Ficus pumila*. Diâmetro dos halos medidos em milímetros (mm).

AMOSTRA	EXTRATO	Folha fresca	Folha seca	Caule fresco	Caule seco	Raiz fresca	Raiz seca	Fruto fresco	Fruto seco	CHX*	RIF**
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	11	10	0	9	0	10	0	0	15	0
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	6	9	11	12	11	14	7	9	13	0
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0	11	14	15	14	16	10	11	18	0
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	8	9	8	9	9	10	0	9	16	0
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	7	11	12	11	12	7	13	15	0
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
	<i>Enterobacter aerogenes</i> LMI-UNIFAL	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0
	<i>Serratia marcescens</i> LMI-UNIFAL	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25922	0	8	10	11	10	11	7	9	10	0
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0
	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (H37)	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	20
	<i>Mycobacterium bovis</i> (BCG)	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	20

\* Clorexidina a 0,12%      \*\* Rifampicina 50 µg

NT: Não testado.

Na avaliação da atividade antimicrobiana também foram feitas a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a determinação da concentração microbicida mínima (CMM) dos extratos de *Ficus pumila* para todos os microrganismos, exceto *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*. A CIM corresponde à menor concentração do extrato capaz de inibir o desenvolvimento visível do microrganismo. Já a CMM é considerada a menor concentração do extrato em que não se observa crescimento celular (BRASIL, 2013).

A determinação da CIM foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, onde foi possível verificar a eficiência dos extratos da planta seca e da planta fresca. Os resultados obtidos demonstraram mínima diferença da CIM entre os extratos preparados com a planta seca e os preparados com a planta fresca. No entanto, menores concentrações inibitórias foram observadas com maior frequência nos extratos preparados com a planta fresca.

Todas as amostras de microrganismos testadas se mostraram sensíveis aos extratos de *Ficus pumila*. Exibindo as menores concentrações mínimas, o extrato de caule foi o mais eficiente, seguido pelos extratos de raiz, fruto e folha, respectivamente.

Em relação à CMM, os extratos preparados com a planta seca demonstraram ser mais efetivos, apresentando menores concentrações microbicidas. O extrato de caule foi o que exibiu melhores resultados, seguindo pelos extratos de raiz e de folha respectivamente.

A Tabela 6 mostra os resultados da CIM e da CMM dos extratos.

Tabela 6: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos de *Ficus pumila*. Resultados expressos em mg/mL.

MICROORGANISMOS	EXTRATOS DE <i>Ficus pumila</i>															
	Folha fresca		Folha seca		Caule fresco		Caule seco		Raiz fresca		Raiz seca		Fruto fresco		Fruto seco	
	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	3,12	ND	12,5	12,5	6,25	ND	6,25	12,5	12,5	ND	6,25	ND	6,25	ND	12,5	ND
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	6,25	ND	6,25	ND	0,39	6,25	0,39	ND	0,78	ND	0,78	ND	0,78	ND	0,78	25
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	6,25	25	6,25	25	3,12	12,5	6,25	25	0,78	ND	6,25	12,5	0,39	25	3,12	25
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	6,25	25	3,12	12,5	6,25	25	3,12	12,5	12,5	25	6,25	12,5	6,25	25	12,5	12,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	6,25	12,5	12,5	12,5	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5	ND	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6,25	25	3,12	25	3,12	25	6,25	12,5	12,5	ND	6,25	12,5	12,5	25	6,25	12,5
<i>Enterobacter aerogenes</i> LMI-UNIFAL	6,25	ND	6,25	12,5	3,12	ND	6,25	6,25	6,25	12,5	6,25	12,5	6,25	12,5	12,5	12,5
<i>Serratia marcescens</i> LMI-UNIFAL	6,25	12,5	6,25	ND	6,25	ND	3,12	25	6,25	ND	6,25	25	6,25	25	6,25	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6,25	25	6,25	25	6,25	25	6,25	25	6,25	ND	6,25	25	12,5	25	6,25	25
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25922	6,25	25	6,25	12,5	6,25	25	6,25	12,5	6,25	ND	6,25	12,5	6,25	ND	6,25	12,5
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	6,25	ND	6,25	ND	6,25	25	6,25	ND	6,25	ND	12,5	25	6,25	25	12,5	25
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	3,12	6,25	3,12	6,25	3,12	12,5	6,25	12,5	3,12	6,25	6,25	12,5	3,12	6,25	6,25	6,25
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601	6,25	25	6,25	12,5	12,5	25	6,25	12,5	6,25	25	6,25	12,5	6,25	25	12,5	12,5

ND = Não detectado nas concentrações utilizadas nos testes.

No teste de difusão em ágar, o extrato de raiz seca apresentou melhores resultados quanto ao espectro de ação e diâmetro do halo de inibição, entretanto, na determinação da CIM e da CMM, o extrato de caule se mostrou mais efetivo. Esta divergência de resultados pode estar possivelmente relacionada à característica física do meio de cultura, dando indícios de que o extrato de raiz seca pode conter substâncias que se difundem melhor em meio de cultura sólido.

As bactérias *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*, assim como as leveduras *Candida albicans* e *Sacharomyces cerevisiae* não exibiram halo de inibição no teste de difusão em ágar, no entanto, se revelaram sensíveis aos extratos de *Ficus pumila* no teste de microdiluição em caldo. É importante salientar que o método de difusão em ágar trata-se de um teste qualitativo em que substâncias de caráter apolar podem não se difundirem bem no meio, já a técnica de microdiluição em caldo consiste em um teste quantitativo e, portanto, mais sensível.

Na literatura existem poucos relatos sobre a atividade antimicrobiana de *Ficus pumila*. Entretanto, vários trabalhos comprovam a atividade antimicrobiana de diferentes espécies do gênero *Ficus*. Ragasa; Juan; Rideout (1999) descrevem a atividade antimicrobiana do extrato metanólico de folhas frescas de *Ficus pumila* contra o *Bacillus subtilis*. A atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de caule e fruto de *Ficus microcarpa* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é citada no trabalho de Sirisha et al. (2010). De acordo com Jagtap et al. (2012), o extrato metanólico da casca de *Ficus glomerata* demonstrou boa atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*. Os extratos etanólicos de raiz de *Ficus racemosa* e *Ficus benghalensis* exibiram boa atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (MURTI; KUMAR, 2011). A atividade antimicrobiana do extrato etanólico de raiz de *Ficus racemosa* contra *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans* também é citada no trabalho de Goyal,(2012). O extrato metanólico da casca do caule de *Ficus carica* apresentou atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris* (AL-YOUSUF et al., 2012).

A atividade antimicrobiana de diferentes espécies do gênero *Ficus* pode estar, possivelmente, relacionada à presença de taninos e flavonoides na planta. Os flavonoides são sintetizados pelas plantas em resposta a infecções microbianas.

Acredita-se que sua atividade se deva a capacidade de complexar com a parede da célula bacteriana, causando a morte do microrganismo. Já os taninos tem recebido grande atenção por acreditar-se que sejam capazes de prevenir uma série de doenças. A atividade antimicrobiana dos taninos pode estar relacionada à sua capacidade de inativar a aderência microbiana, enzimas e proteínas de transporte (GOYAL, 2012).

Estes estudos corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho, dando indícios de que não apenas a *Ficus pumila*, mas inúmeras plantas do gênero apresentam princípios ativos com atividade antimicrobiana.

### **5.3.2 Avaliação da atividade antioxidante (sequestro de radical livre DPPH)**

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos da folha, caule, fruto e raiz de *Ficus pumila* foi determinada pelo método do radical DPPH. Esta técnica permite a avaliação da atividade antioxidante dos extratos por meio da capacidade de sequestrar radicais livres em determinado período de tempo. Nesse caso, a atividade antioxidante é determinada pela redução de 50% da concentração inicial de DPPH, ou seja, pelo valor de  $EC_{50}$ . Considera-se que quanto menor o valor de  $EC_{50}$ , maior a atividade antioxidante do extrato (MORENO e NEUZA, 2010).

Desse modo, de acordo com os valores de  $EC_{50}$ , a maior atividade antioxidante foi exibida pelos extratos etanólicos de caule fresco e de raiz seca de *F. pumila*. O extrato etanólico de caule fresco, no entanto, foi o mais efetivo, uma vez que apresentou o menor valor de  $EC_{50}$ . Os resultados da atividade antioxidante podem ser visualizados na Tabela 7.

Tabela 7: Atividade antioxidante dos extratos etanólicos de *Ficus pumila*.

Extratos Etanólicos	% Sequestro de radical DPPH (a 100 µg/mL)*	EC <sub>50</sub> (µg/mL)	DPPH remanescente (%)
Folha fresca	61,85 ± 1,1 <sup>g</sup>	58,56	38,15
Folha seca	83,18 ± 0,6 <sup>c</sup>	25,28	16,82
Caule fresco	82,93 ± 0,4 <sup>c</sup>	12,81	17,07
Caule seco	81,85 ± 0,4 <sup>d</sup>	25,79	18,15
Raiz fresca	83,73 ± 0,4 <sup>c</sup>	25,03	16,27
Raiz seca	81,73 ± 0,5 <sup>d</sup>	13,20	18,27
Fruto fresco	77,13 ± 0,4 <sup>e</sup>	36,60	22,87
Fruto seco	87,59 ± 0,7 <sup>b</sup>	28,50	12,41
Quercetina	81,44 ± 0,2 <sup>d</sup>	4,57	18,56
Ácido Ascórbico	90,43 ± 0,3 <sup>a</sup>	6,49	9,57
BHT**	63,70 ± 0,1 <sup>f</sup>	70,11	36,30

\* Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Scott-Knott p<0,05).

\*\* BHT: Butil Hidroxi Tolueno

Com base na Tabela 7 é possível verificar que, com exceção do extrato de caule fresco, os menores valores de EC<sub>50</sub> foram apresentados pelos extratos preparados a partir da planta seca, dando indícios de que o método de extração com a planta seca é capaz de concentrar uma maior quantidade de compostos antioxidantes.

De acordo com Sirisha et al. (2010), espécies do gênero *Ficus* são ricas em flavonoides, compostos fenólicos que conferem uma forte propriedade antioxidante a essas plantas, auxiliando na prevenção e tratamento de inúmeras doenças. Os compostos fenólicos atuam como sequestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais (MORENO; NEUZA, 2010), sendo estes provavelmente os responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos de *Ficus pumila*.

O trabalho de Sirisha et al. (2010) relata a atividade antioxidante de extratos metanólicos de caule, frutos e folhas de *Ficus microcarpa* e de extrato aquoso de caule seco de *Ficus glomerata*. De acordo com o autor, a atividade antioxidante



pode ser atribuída aos flavonoides e compostos fenólicos encontrados nos extratos analisados. Em seu estudo, Leong et al. (2008) descreve uma forte atividade antioxidante do extrato hidroetanólico da folha de *Ficus pumila*, no qual verificou-se a presença de compostos fenólicos e flavonoides, evidenciando que a atividade antioxidante se deve principalmente à presença de compostos fenólicos.

#### 5.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE À CULTURA CELULAR

A avaliação da citotoxicidade é uma etapa essencial no processo de desenvolvimento de novas drogas, pois, permite determinar a concentração a ser utilizada e fornece dados importantes quanto aos possíveis danos celulares (ARAÚJO et al., 2008). Para ser aprovada no teste de citotoxicidade, a substância analisada não deve provocar a morte das células nem afetar as funções celulares. Por meio da utilização de técnicas de cultura de células, os testes de citotoxicidade podem revelar a ocorrência de danos como lise celular e inibição do crescimento das células (DAGUANO; SANTOS; ROGERO, 2007).

Normalmente, a citotoxicidade é verificada por meio de testes de viabilidade celular. O teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um dos mais empregados para determinar a viabilidade de células. Esse método permite estimar a viabilidade celular por meio da medida da atividade mitocondrial. É baseado na habilidade de células vivas de metabolizar o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) em cristais de formazan.

De acordo com os resultados obtidos, a avaliação da citotoxicidade dos diferentes extratos de *Ficus pumila* sobre a cultura de células BHK-21 (células de rim de hamster neonato) demonstrou que os extratos de caule, raiz e fruto frescos e secos não foram citotóxicos em nenhuma das concentrações testadas. Por outro lado, os extratos de folha fresca e seca exibiram citotoxicidade em altas concentrações. O extrato de folha seca revelou ser pouco citotóxico nas concentrações de 2,5 e 1,25 mg/mL. Já o extrato de folha fresca demonstrou ser citotóxico nas concentrações de 5 a 1,25 mg/mL, exibindo uma concentração citotóxica ao nível de 50% de 5 mg/mL (Figura 5).

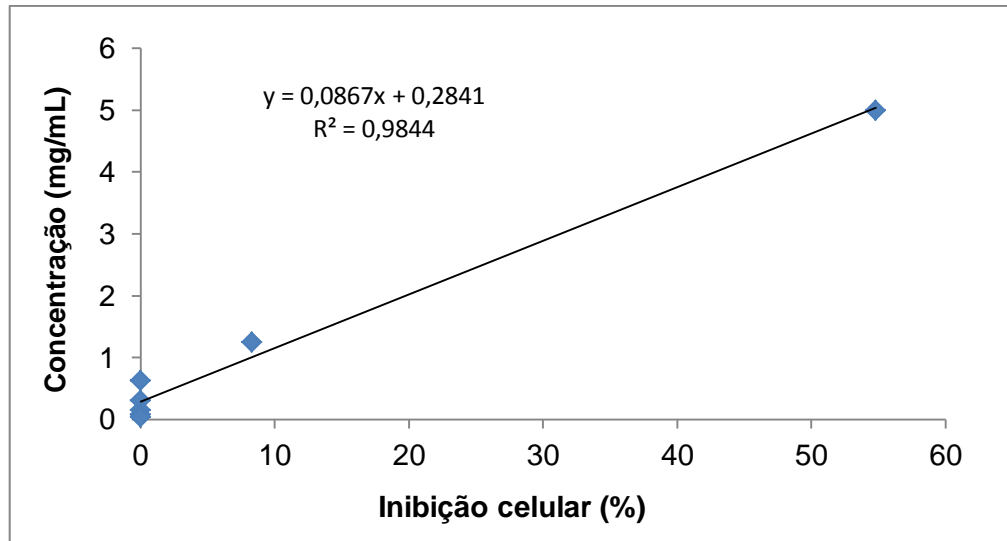


Figura 5: Efeito do extrato de folha fresca de *Ficus pumila* sobre a viabilidade de células BHK-21.

Não existem muitos relatos sobre a citotoxicidade de extratos de *Ficus pumila* na literatura. De acordo com o trabalho de Ramcharani et al. (2010), os extratos metanólicos das folhas e do caule de *Ficus pumila* demonstram atividade citotóxica frente à linhagem de células de leucemia humana (MT-4). De acordo com os autores, o extrato bruto de *Ficus pumila* exibiu valor de  $IC_{50}$  igual a 131  $\mu\text{g/ml}$ . Este foi o primeiro trabalho a demonstrar a atividade citotóxica de extratos de *Ficus pumila* frente à linhagem de células de leucemia humana. Os autores atribuem a atividade citotóxica dos extratos de *Ficus pumila* à presença de compostos fenólicos e sesquiterpenos na planta. Acredita-se que estes compostos possam desencadear vias de sinalização intracelular que induzem a morte das células analisadas.

Estes resultados diferem dos encontrados no presente trabalho. Esta diferença pode estar relacionada ao tipo de célula utilizada, uma vez que a metodologia empregada para avaliar a viabilidade celular foi a mesma. No entanto, é necessário que outros estudos sejam realizados para confirmar a ação citotóxica de extratos de *F. pumila*.

## 5.5 RELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS

De acordo com a Tabela 8:

- Todos os extratos apresentaram taninos e flavonoides em sua composição. Esses metabólitos podem estar possivelmente relacionados com as atividades antimicrobiana, antioxidante e citotóxica da *F. pumila*.
- Os altos teores de flavonoides totais exibidos pelos extratos da folha podem ter relação com sua citotoxicidade.
- O teor de flavonoides pode possivelmente estar relacionado com a atividade antimicrobiana dos extratos.
- A melhor atividade antioxidante exibida pelo do caule fresco pode ser justificada pela presença de outras moléculas, uma vez que esse extrato apresentou baixos teores de flavonoides e compostos fenólicos totais.

Tabela 8: Resultados dos testes realizados para os extratos de *Ficus pumila*.

Extratos \ Testes	Taninos	Flavonoides	*Teor de comp. fenólicos	**Teor de flavonoides	***Atividade antioxidante	Difusão em ágar (halo inibição)	Citotoxicidade
Folha fresca (FF)	+	+	153,21	9,38	58,56	Inibiu 3 (6 a 11 mm)	+
Folha seca (FS)	+	+	154,29	15,30	25,28	Inibiu 6 (7 a 11 mm)	+
Caule fresco (CF)	+	+	84,80	2,56	12,81	Inibiu 5 (8 a 14 mm)	-
Caule seco (CS)	+	+	492,27	1,29	25,79	Inibiu 6 (9 a 15 mm)	-
Raiz fresca (RF)	+	+	370,24	2,71	25,03	Inibiu 5 (9 a 14 mm)	-
Raiz seca (RS)	+	+	724,39	1,63	13,20	Inibiu 6 (10 a 16 mm)	-
Fruto fresco (FrF)	+	+	298,08	5,70	36,60	Inibiu 4 (7 a 10 mm)	-
Fruto seco (FrS)	+	+	407,26	3,05	28,50	Inibiu 5 (9 a 13 mm)	-

\* Miligramas de ácido gálico por grama de amostra (mg AG/g amostra) dos extratos de *Ficus pumila*.

\*\* Miligramas de quercetina por grama de amostra (mg quercetina/g amostra) dos extratos etanólicos de *Ficus pumila*.

\*\*\* EC<sub>50</sub> (µg/mL): Concentração capaz de sequestrar 50% dos radicais DPPH da solução.

## 7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados neste trabalho, foi possível concluir que:

1. Tanto os extratos preparados com a planta fresca quanto os preparados com a planta seca apresentam taninos e flavonoides em sua composição.
2. Os extratos da planta seca exibiram maiores teores de compostos fenólicos e os da planta fresca, maiores teores de flavonoides totais.
3. Exibindo a menor concentração eficaz para sequestrar 50% dos radicais DPPH, o extrato de caule fresco apresentou a maior atividade antioxidante.
4. Apenas *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis* foram sensíveis aos extratos de *F. pumila*. A melhor atividade antimicrobiana foi exibida pelo extrato de raiz seca.
5. Os extratos de caule, raiz e fruto frescos e secos não apresentaram citotoxicidade nas concentrações avaliadas.
6. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram para o emprego da *Ficus pumila* para fins terapêuticos, uma vez que os testes realizados confirmam a presença de bioativos em sua composição, sugerindo suas potencialidades farmacológicas.

## REFERÊNCIAS

- AL-YOUSUF, H. H. H. et al. Antimicrobial Activity Of Ethanolic Root Extract Of *Ficus racemosa* Linn. **International Journal Of Drug Development & Research**, Bagdá, v. 4, n. 4, p.307-310, dez. 2012.
- ARAÚJO, S. A. C. de. et al. Avaliação in vitro da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, Ceará, v. 18, n. 1, p.25-31, 2008.
- ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. de M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p.775-790, 2012.
- BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, Kolkata, v. 90, n. 4, p.727-733, maio 2005.
- BARNI, S. T.; FILHO, V. C.; COUTO, A. G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Brasil. 19 (4): 865-870, 2009.
- BELÉM, L. F.. **Estudo epidemiológico da Pitiríase versicolor no estado da Paraíba e avaliação química e antifúngica de produtos naturais e sintéticos contra seu agente etiológico**. 2002. 178 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2002.
- BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, n.3/4, 2005.
- BRASIL. Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Antimicrobianos - Bases teóricas e uso clínico**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/propriedades.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/propriedades.htm)>. Acesso em: 03 jul. 2013.
- CAVALCANTE, G. M. et al. Atividade antimicrobiana de *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae) sobre o desenvolvimento de *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*. **Scientia Plena**, v. 9, n. 2, ISSN: 1808-2793, fev. 2013.
- CHOI, Y. M. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **Food Science And Technology**, Seoul, v. 39, n. 7, p.756-761, set. 2006.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard- Sixth edition. M7-A6. Wayne, PA, USA: CLSI, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts**. Approved Guideline-Second Edition. M44-A2. Wayne, PA, USA: CLSI, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Approved standard- Third Edition. M27-A3. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 1031, 1994.

CRAGG, G. M. et al. International collaboration in drug discovery and development: the NCI experience. **Pure And Applied Chemistry**, v. 71, n. 9, p.1619-1633, 1999.

DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. **Matéria**, v. 12, n. 1, p.134-139, 2007.

EINBOND, L. S. et al. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, Miami, v. 84, n. 1, p.23-28, jan. 2004.

ELIAS, L. G. et al. Efeito de vespas não-polinizadoras sobre o mutualismo *Ficus* – vespas de figos. **Iheringia: Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 97, n. 3, p.253-256, 2007.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FONTENELLE, R. O. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, Fortaleza, v. 59, n. 5, p.934-940, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 2, p.374-381, 2007.

GOYAL, P. K. Antimicrobial Activity Of Ethanolic Root Extract Of *Ficus racemosa* Linn. **International Journal Of Chemtech Research**, Jaipur, v. 4, n. 4, p.1765-1769, oct-dez. 2012.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. da S.; PUPO, M. T. ANTIBIÓTICOS: IMPORTÂNCIA TERAPÊUTICA E PERSPECTIVAS PARA A DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, p.667-679, 2010.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals Of Epidemiology**, Miami, v. 15, n. 9, p.686-699, 2005.

JAGTAP, S. G. et al. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LINN. BARK. **International Research Journal Of Pharmacy**, Pune, v. 3, n. 5, p.281-284, 2012.

JOLY, A. B. **BOTÂNICA**: Introdução à taxonomia vegetal. 4ª São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1977.

KALIA, K. et al. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56,10129 – 10134, 2008.

KAMBA, A. S.; HASSAN, L. G., Phytochemical screening and antimicrobial activities of *Euphorbia balsamifera* leaves stems and root against some pathogenic microorganisms. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 9, p. 645-652, 2010.

KAUR, J. Pharmacognostical and Preliminary Phytochemical Studies on the Leaf Extract of *Ficus Pumila* Linn. **Journal Of Pharmacognosy And Phytochemistry**, Solan, nov. 2012. Disponível em: <<http://www.phytojournal.com/>>. Acesso em: 27 jun. 2013.

KITAJIMA, J. et al. Constituents of *Ficus pumila* Leaves. **Chemical And Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 46, n. 10, p.1647-1649, 1998.

KITAJIMA, J.; KIMIZUKA, K.; TANAKA, Y. Three new sesquiterpenoid glucosides of *Ficus pumila* fruit. **Chemical And Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 48, p.77-80, 2000.

LAWRENCE, G. H. M. **TAXONOMIA DAS PLANTAS VASCULARES**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1951.

LEONG, C. N. A. et al. Antioxidant flavonoid glycosides from the leaves of *Ficus pumila* L. **Food Chemistry**, Okinawa, v. 109, n. 2, p.415-420, 2008.

LIAO, C. et al. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Methanol Extract of *Ficus pumila* L. in Mice. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, Taiwan, 2012.

LORENZI, H.; HERMES, M. S. **PLANTAS ORNAMENTAIS NO BRASIL**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2001. 1087 p.

MACIEL, M. A. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p.429-438, maio 2002.

MALEKI, S. et al. Antibacterial activity of the fruits of Iranian *Torilis leptophylla* against some clinical pathogens. **Pakistan Journal Of Biological Sciences**, Ahwaz, v. 11, n. 9, p.1286-1289, maio 2008.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, p.517-543, 2001.



- MICHELIN, D. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 4, p.316-320, 2005.
- MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, Recife, v. 28, n. 5, p.892-896, set. 2005.
- MIGLIATO, K. F. et al. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Brasil. 17(1): 94-101, 2007.
- MORENO, L. D. M.; NEUZA, J. Potencial antioxidante de extratos de sementes de limão (*Citrus limon*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São José do Rio Preto, v. 30, n. 2, p.489-493, abr-jun. 2010.
- MUHAMMED ASHRAF, V. K. et al. EVALUATION OF ANTI ULCER ACTIVITY OF *FICUS PUMILA* L. LEAF EXTRACT IN ALBINO RATS. **Global Journal Of Research On Medicinal Plants & Indigenous Medicine**, Tamilnadu, p. 340-351. 30 jul. 2012.
- MURTI, K.; KUMAR, U. Antimicrobial Activity of *Ficus benghalensis* and *Ficus racemosa* roots L. **American Journal Of Microbiology**, v. 2, n. 1, p.21-24, 2011.
- NOVAIS, T. S et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 13, n. 2, p.05-08, 2003.
- PISTELLI, L.; CHIellini, E. E.; MORELLI, I. Flavonoids from *Ficus pumila*. **Biochemical Systematics And Ecology**, v. 28, n. 3, p.287-289, 2000.
- OPLUSTIL, C. P. Resistência aos antimicrobianos: assunto velho, novas preocupações. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p.82-83, 2012.
- OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p.301-307, jun. 2008.
- PADILHA, M. M. et al. Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta, *Morus nigra* L., Moraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 4, p.621-626, ago. 2010.
- PEREIRA, C. B. et al. Atividade Antimicrobiana e Citotoxicidade do extrato bruto obtido de *Morus Alba* L. (Moraceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Santa Maria, v. 33, n. 1, p.133-137, abr. 2012.
- PINTO, A. C. et al. PRODUTOS NATURAIS: ATUALIDADE, DESAFIOS E PERSPECTIVAS. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 25, Supl. 1, p.45-61, jul. 2002.
- RAGASA, C .Y.; JUAN, E.; RIDEOUT, J. A. A triterpene from *Ficus pumila*. **Journal Of Asian Natural Products**, v. 4, n. 1, p.269-275, 1999.

- RAHAL, J. J.; URBAN, C.; SEGAL-MAURER, S. Nosocomial antibiotic resistance in multiple gram-negative species: experience at one hospital with squeezing the resistance balloon at multiple sites. **Clinical Infectious Diseases**, New York, v. 34, n. 4, p.82-83, 2002.
- RAMCHARANI, G.; CLEMENTI, Y. N.; MAXWELL, A. R. Cytotoxic activity of selected West Indian medicinal plants against a human leukaemia cell line. **West Indian Medical Journal**. v. 59, n. 6, p. 597-601, dez. 2010.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon** 39, Porto Alegre, p.603-613, 16 nov. 2001.
- RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 2, p.67-70, fev. 2007.
- ROGUES, A. M. et al. Relationship between rates of antimicrobial consumption and the incidence of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 47 French hospitals. **Infection Control And Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 12, p.1389-1395, 2007.
- SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: standards and regulation. **Fitoterapia**, Kharagpur, v. 86, n. 6, p.462-471, 2010.
- SEYYEDNEJAD, S. M. et al. Antibacterial Activity of *Prunus mahaleb* and Parsley (*Petroselinum crispum*) Against Some Pathogen. **Asian Journal Of Biological Sciences**, v. 1, n. 1, p.51-55, 2008.
- SILVA, R. B., ALMEIDA, C. R. CHAVASCO, J.M.; CHAVASCO, J.K. Antimicrobacterial Activity Evaluation and MIC Determination of *Bixa Orellana* L Liophilized Hydroalcoholic Extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 20(2):171-174, Abr.-mai., 2010.
- SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, Florianópolis, v. 29, n. 4, p.844-855, 2006.
- SILVEIRA, L.M.S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.** v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M.. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152–178, 1999.
- SIRISHA, N. et al. Antioxidant Properties of *Ficus Species* – A Review. **International Journal Of Pharmtech Research**, Kadapa, v. 2, n. 4, p.2174-2182, oct-dez. 2010.
- SOUSA, J. O. de et al. Infecção hospitalar em unidade de terapia intensiva neonatal: uma revisão da literatura. **Revista Interdisciplinar UNINOVAFAPI**, Teresina, v. 3, n. 5, p.77-80, set. 2012.

- SOUSA, J. C. **Manual de Antibióticos Antibacterianos**. 2ª Edição. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, 2006.
- SOUZA, C. S. Uma Guerra Quase Perdida. **Revista Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 23, p.27-35, 1998.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **BOTÂNICA SISTEMÁTICA**: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2005.
- TOSHIO, F.; KIYOSHI, K.; SUMIO, T.. Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from *Morus* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7, p.708-711, dez. 2005.
- TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O GÊNERO *Copaifera* L. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p.273-286, 2002.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 3, p.519-528, 2005.
- VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. O gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.
- VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Development Trends**, Leiden, v. 3, n. 5, p.232-238, 1998.
- VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millenium: leadfinding and biotechnology. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, Leiden, v. 52, n. 3, p.253-262, 2000.
- WILLS, R. B.; BONE, K.; MORGAN, M. Herbal products: active constituents, modes of action and quality control. **Nutrition Research Reviews**, Ourimbah, v. 13, n. 1, p.47-77, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva: Switzerland, 1998.
- YEN, W. J.; CHANG, L. W. Duh PD: Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. **Food Sci Technol**. v.38, n.1, p. 193-200, 2005.