

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Wesley Gonçalves de Moraes

**Composição química e atividade antibacteriana *in vitro* de extratos metanólicos obtidos
de folhas e frutos de *Rubus grandifolius* Lowe**

Juiz de Fora

2022

Wesley Gonçalves de Moraes

Composição química e atividade antibacteriana *in vitro* de extratos metanólicos obtidos de folhas e frutos de *Rubus grandifolius* Lowe

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas - Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Orientador: Profa. Dra. Maria Silvana Alves

Coorientadora: Profa. Dra. Paula Cristina Machado Ferreira Castilho

Coorientador: Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gonçalves de Moraes, Wesley.

Composição química e atividade antibacteriana in vitro de extratos metanólicos obtidos de folhas e frutos de *Rubus grandifolius* Lowe / Wesley Gonçalves de Moraes. -- 2022.

114 f. : il.

Orientadora: Maria Silvana Alves

Coorientadores: Orlando Vieira de Souza, Paula Cristina Machado Ferreira Castilho

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

1. *Rubus grandifolius*. 2. Antibacterianos. 3. *Pseudomonas aeruginosa*. 4. Plantas Medicinais. I. Alves, Maria Silvana, orient. II. Vieira de Souza, Orlando, coorient. III. Cristina Machado Ferreira Castilho, Paula, coorient. IV. Título.

Wesley Gonçalves de Moraes

Composição química e atividade antibacteriana in vitro de extratos metanólicos obtidos de folhas e frutos de *Rubus grandifolius* Lowe.

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
Graduação em
Ciências
Farmacêuticas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências
Farmacêuticas. Área
de
concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos
Ativos.

Aprovada em 21/01/2022.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Orlando Vieira de Sousa

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Alberto Carlos Pires Dias

Universidade do Minho

Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 24/01/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Orlando Vieira de Sousa, Professor(a)**, em 17/02/2022, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Maria Pinto Vilela, Professor(a)**, em 21/02/2022, às 09:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alberto Carlos Pires Dias, Usuário Externo**, em 03/03/2022, às 10:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0655528** e o código CRC **0E409D78**.

Dedico este trabalho à minha família, meu alicerce!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus pelo dom da vida e por me dar forças e saúde para ir sempre em busca dos meus sonhos. Obrigado, meu Deus, por estar sempre junto de mim guiando meus passos;

Aos meus pais Marcos e Sônia, pelo amor incondicional, carinho, incentivos, broncas e cobranças; tudo isso me faz crescer e ser uma pessoa melhor a cada dia; e ao meu irmão Wallace, por todo suporte e afeto: amo muito vocês!

À minha namorada Cinthia, por todo amor, companheirismo, paciência e por ser presença em todos os momentos da minha vida;

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Maria Silvana Alves, pela oportunidade e pela confiança depositada em mim, pela dedicação, paciência e por sempre exercitar sua competência para que eu alcançasse o melhor de mim. Agradeço de coração por todo conhecimento e sabedoria compartilhados comigo e espero retribuir tudo isso de alguma forma, um dia;

À minha coorientadora Profa. Dra. Paula Cristina Machado Ferreira Castilho, do Centro de Química da Madeira da Universidade da Madeira, Funchal, Portugal, pelo fornecimento dos extratos metanólicos obtidos de diferentes espécies vegetais procedentes da Ilha da Madeira e Açores, objeto do presente estudo e, principalmente, pelo estabelecimento da parceria científica;

Ao meu grande colaborador, Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa, do Laboratório de Química Biomedicinal e Farmacologia Aplicada da Faculdade de Farmácia da UFJF, pela parceria, dedicação e conhecimentos transmitidos principalmente na Farmacologia de Produtos Naturais;

À toda equipe do Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular do Centro de Pesquisas Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFJF, por toda parceria, conhecimentos e experiências compartilhadas; agradeço a todos de coração, pois sem a ajuda de vocês este trabalho não seria possível;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e da Faculdade de Farmácia da UFJF, pelos ensinamentos e contribuição científica;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (CDS-APQ-04680-10), pela concessão da bolsa e auxílio financeiro cuja gestão racional dos recursos viabilizou inclusive o presente estudo, respectivamente;

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste estudo; a todos vocês, o meu muito obrigado!

"O único lugar aonde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário!"

Albert Einstein

RESUMO

Rubus grandifolius Lowe (Rosaceae Juss.) é uma espécie vegetal encontrada endêmica e exclusivamente no Arquipélago da Madeira, Portugal. Seus frutos possuem grande valor comercial para a indústria de alimentos, sendo utilizados na produção de geleias, sucos e licores. Tradicionalmente, a população local utiliza suas folhas, flores e frutos como adstringente para crianças e remédio no tratamento de diabetes, depurativo, diurético, tônico ou fortificante e no alívio das dores de garganta, sendo ainda usadas no preparo de chás ou infusões alcoólicas. Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo investigar a composição química e a atividade antibacteriana *in vitro* de extratos metanólicos obtidos de folhas e frutos de *R. grandifolius*. Folhas e frutos foram extraídos em metanol e metanol/água (80:20, v/v) acidificado com ácido acético à 7%, respectivamente. Os perfis químicos dos extratos de folhas e frutos de *R. grandifolius* foram estabelecidos por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (CLAE-DAD-ESI/EMⁿ) e revelaram a presença de diversas classes de compostos fenólicos, dentre elas ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, ácidos orgânicos, terpenoides e cumarinas. Quanto ao aspecto microbiológico, inicialmente, vinte extratos metanólicos obtidos de diferentes espécies vegetais procedentes da Ilha da Madeira e Açores, Portugal, foram submetidos a uma triagem da atividade antibacteriana *in vitro* por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) seguida da classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático. Foram testadas *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* [(ATCC 6538), (ATCC 25923) e (ATCC 29213)], *Escherichia coli* [(ATCC 10536) e (ATCC 25922)], *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis (ATCC 10708), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 13311) e *Pseudomonas aeruginosa* [(ATCC 9027) e (ATCC 27853)]. Cinco extratos mais promissores foram selecionados e submetidos à nova determinação de CIM e CBM empregando cepas clínicas humanas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) 1485279, *Salmonella* spp. 1507708 resistente à levofloxacina, *Escherichia coli* 2856403 produtora de β -lactamase de espectro ampliado e resistente à ciprofloxacina e norfloxacina e *Pseudomonas aeruginosa* 2854386 resistente à ceftioxima, ceftriaxona e tigeciclina. O extrato de frutos de *R. grandifolius* foi o mais efetivo dentre todos os extratos avaliados, sendo ativo frente a todas as cepas ATCC[®] testadas, com valor de CIM igual a 5000 μ g/mL, excetuando *S. aureus* (ATCC 6538) (CIM = 2500 μ g/mL), e efeito bacteriostático, com exceção de *P. aeruginosa* [(ATCC 9027) e (ATCC 27853)], onde se observou efeito bactericida. Com relação as cepas clínicas humanas, o extrato dos frutos de *R. grandifolius* foi

ativo frente a todas as cepas testadas, com CIM igual a 5000 µg/mL e efeito bacteriostático, com exceção de *P. aeruginosa* 2854386, que revelou efeito bactericida. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que *R. grandifolius*, de modo especial o extrato obtido de seus frutos, foi capaz de inibir o crescimento de cepas ATCC® e clínicas humanas de *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* e *P. aeruginosa*, com efeito bactericida sobre essa última cepa.

Palavras-chave: *Rubus grandifolius*. Antibacterianos. *Pseudomonas aeruginosa*. Plantas Medicinais.

ABSTRACT

Rubus grandifolius Lowe (Rosaceae Juss.) is a plant species found endemic and exclusively in the Madeira Archipelago, Portugal. Its fruits have great commercial value for the food industry, being used in the production of jellies, juices and liqueurs. Traditionally, the local population uses its leaves, flowers and fruits as an astringent for children and as a medicine to treat diabetes, depurative, diuretic, tonic and to relieve sore throats, being also used in the preparation of teas or alcoholic infusions. Based on the above, this study aimed to investigate the chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of methanol extracts obtained from leaves and fruits of *R. grandifolius*. Leaves and fruits were extracted in methanol and methanol/water (80:20, v/v) acidified with 7% acetic acid, respectively. The chemical profiles of *R. grandifolius* leaf and fruit extracts were established by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-DAD-ESI/EMⁿ) and revealed the presence of several classes of phenolic compounds, including phenolic acids, tannins, flavonoids, organic acids, terpenoids and coumarins. As for the microbiological aspect, initially, twenty methanolic extracts obtained from different plant species from Madeira Island and Azores, Portugal, were screened for the *in vitro* antibacterial activity by determining the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimal Bactericidal Concentration (MBC) followed by the classification of the antibacterial effect as bactericidal or bacteriostatic. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* [(ATCC 6538), (ATCC 25923) and (ATCC 29213)], *Escherichia coli* [(ATCC 10536) and (ATCC 25922)], *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis (ATCC 10708), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 13311) and *Pseudomonas aeruginosa* [(ATCC 9027) and (ATCC 27853)] were tested. Five most promising extracts were selected and subjected to further determination of MIC and MBC using human clinical strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 1485279, *Salmonella* spp. 1507708 resistant to levofloxacin, *Escherichia coli* 2856403 extended spectrum β -lactamase producer and resistant to ciprofloxacin and norfloxacin and *Pseudomonas aeruginosa* 2854386 resistant to cefoxitin, ceftriaxone and tigecycline. The *R. grandifolius* fruit extract was the most effective among all evaluated extracts, being active against all ATCC[®] strains tested, with a MIC value equal to 5000 $\mu\text{g/mL}$, except for *S. aureus* (ATCC 6538) (MIC = 2500 $\mu\text{g/mL}$), and bacteriostatic effect, with the exception of *P. aeruginosa* [(ATCC 9027) and (ATCC 27853)], where a bactericidal effect was observed. Regarding human clinical strains, the extract of *R. grandifolius* fruits was active against all strains tested, with MIC equal to 5000 $\mu\text{g/mL}$ and bacteriostatic effect, with the exception of *P. aeruginosa* 2854386, which showed a bactericidal

effect. The results obtained in the present study demonstrated that *R. grandifolius*, especially the extract obtained from its fruits, was able to inhibit the growth of ATCC® and human clinical strains of *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* and *P. aeruginosa*, with a bactericidal effect on this last strain.

Keywords: *Rubus grandifolius*. Anti-Bacterial Agents. *Pseudomonas aeruginosa*. Medicinal Plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Imagem gráfica do percentual dos tipos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) em hospitais.....	31
Figura 2	- Percentual de distribuição dos micro-organismos notificados como agentes etiológicos de Infecções Primárias da Corrente Sanguínea (IPCS) em pacientes em uso de Cateter Venoso Central (CVC) hospitalizados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) adulto, neonatal e pediátrica no Brasil em 2017.....	33
Figura 3	- Imagem ilustrativa da estimativa das principais causas de morte no mundo em 2050.....	35
Figura 4	- Imagem gráfica do n° de fontes de novos antibióticos no período de janeiro de 1981 a setembro de 2019.....	38
Figura 5	- Mapa ilustrativo da distribuição geográfica mundial de espécies de Rosaceae.....	39
Figura 6	- Mapa ilustrativo da distribuição geográfica no Brasil de espécies de Rosaceae.....	40
Figura 7	- Mapa ilustrativo da distribuição geográfica global de <i>Rubus grandifolius</i>	44
Figura 8	- Fotografia das folhas, frutos (amoras) e flores de <i>Rubus grandifolius</i> coletados em dois diferentes locais na Ilha da Madeira, Portugal, em setembro de 2014.....	44
Figura 9	- Estrutura química básica dos principais compostos fenólicos.....	51
Figura 10	- Estrutura básica do ácido benzoico e suas respectivas substituições que originam diferentes ácidos hidroxibenzoicos.....	52
Figura 11	- Estrutura básica do ácido cinâmico e suas respectivas substituições que originam diferentes ácidos hidroxicinâmicos.....	53
Figura 12	- Imagem ilustrativa dos dados de sensibilidade da cepa <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) 1485279 isolada de hemocultura (sangue) e identificada e testada pelo sistema VITEK®2.....	62
Figura 13	- Imagem ilustrativa dos dados de sensibilidade da cepa <i>Escherichia coli</i> 2856403 produtora de β -lactamase de espectro ampliado e resistente à	

	ciprofloxacina e norfloxacina isolada de urina e identificada e testada pelo sistema VITEK [®] 2.....	63
Figura 14	- Imagem ilustrativa dos dados de sensibilidade da cepa <i>Salmonella</i> spp. 1507708 resistente à ciprofloxacina e levofloxacina isolada de hemocultura (sangue) e identificada e testada pelo sistema VITEK [®] 2.....	64
Figura 15	- Imagem ilustrativa dos dados da cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2854386 resistente à tigeciclina, cefoxitina e ceftriaxona isolada de hemocultura (sangue) e identificada e testada pelo sistema VITEK [®] 2.....	65
Figura 16	- Esquema representativo do procedimento de diluição seriada realizado em placa de microtitulação.....	69
Figura 17	Esquema ilustrativo dos controles da determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição em caldo.....	69
Figura 18	- Esquema ilustrativo da organização das placas de microtitulação para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo dos extratos metanólicos de diferentes partes de plantas procedentes da Ilha da Madeira e Açores, Portugal (Placa 1), dos antibióticos/controles positivos utilizados nos ensaios com as cepas ATCC [®] e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina 1485279 (Placa 2), dos antibióticos/controles positivos utilizados no ensaio com <i>Salmonella</i> spp. 1507708 e <i>Escherichia coli</i> 2856403 (Placa 3) e dos controles negativos dos ensaios (Placa 4).....	70
Figura 19	- Esquema ilustrativo do procedimento para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático.....	72
Figura 20	- Cromatogramas obtidos por CLAE-ESI/EM ⁿ dos extratos metanólicos das folhas de <i>Rubus grandifolius</i> coletados em Funchal (FX) e Machico (MX).....	81
Figura 21	- Cromatogramas obtidos por CLAE-ESI/EM ⁿ dos extratos metanólicos dos frutos de <i>Rubus grandifolius</i> coletados em Funchal (FX) e Machico (MX).....	81

Figura 22 - Cromatogramas obtidos por CLAE-ESI⁺/EMⁿ dos extratos metanólicos dos frutos de *Rubus grandifolius* coletados em Funchal (FX) e Machico (MX)..... 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Classe química, função inibida, efeito antibacteriano e exemplo de antibióticos descobertos na "era de ouro".....	30
Tabela 2	- Principais agentes etiológicos de infecções relacionadas à assistência à saúde e respectivos sítios de isolamento no Brasil em 2004.....	32
Tabela 3	- Principais procedimentos médicos, infecções relacionadas à assistência à saúde e agentes etiológicos no Brasil em 2004.....	32
Tabela 4	- Lista de patógenos prioritários para guiar a pesquisa, a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos publicada pela Organização Mundial da Saúde em 2017.....	36
Tabela 5	- Dados dos principais polifenóis identificados em extratos metanólicos de <i>Rubus grandifolius</i> descritos na literatura.....	47
Tabela 6	- Lista dos vinte extratos metanólicos obtidos de diferentes espécies vegetais da Ilha da Madeira e Açores, Portugal.....	56
Tabela 7	- Condições do procedimento da análise dos extratos metanólicos das folhas e frutos de <i>Rubus grandifolius</i> por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> (CLAE-DAD-ESI/EM ⁿ).....	59
Tabela 8	- Intervalo dos valores de Concentração Inibitória Mínima para o controle de qualidade do Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) de organismos não fastidiosos segundo o documento M100-S30 do <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>	66
Tabela 9	- Descrição dos sistemas solvente/diluente utilizados no preparo das soluções estoque dos vinte extratos metanólicos das diferentes partes de plantas procedentes da Ilha da Madeira e Açores, Portugal, para realização do método de microdiluição em caldo.....	67
Tabela 10	- Descrição dos sistemas solvente/diluente utilizados no preparo das soluções estoque e de uso dos antibióticos para realização do teste de microdiluição em caldo.....	67
Tabela 11	- Valores da Concentração Inibitória Mínima dos extratos metanólicos de diferentes partes de plantas provenientes da Ilha da Madeira e Açores, Portugal, e de ampicilina e cloranfenicol frente cepas ATCC®.....	74

Tabela 12	- Valores da Concentração Inibitória Mínima dos cinco extratos metanólicos de diferentes partes de plantas provenientes da Ilha da Madeira e Açores, Portugal, e de ampicilina, cloranfenicol e levofloxacina frente às quatro cepas clínicas testadas.....	76
Tabela 13	- Caracterização por CLAE-ESI/EM ⁿ dos fitoconstituintes dos extratos metanólicos de frutos de <i>Rubus grandifolius</i> (FX: Funchal; MX: Machico).....	82
Tabela 14	- Caracterização por CLAE-ESI ⁺ /EM ⁿ de antocianinas dos extratos metanólicos de frutos de <i>Rubus grandifolius</i> (FX: Funchal; MX: Machico).....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AHBs	Ácidos hidroxibenzoicos
AHCs	Ácidos hidroxicinâmicos
AMH	Ágar Müeller-Hinton
AMP	Ampicilina
ANT	Antibiótico
ATCC [®]	do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	do inglês, <i>adenosine triphosphate</i>
BHI	do inglês, <i>brain heart infusion</i>
CF	Compostos fenólicos
CMH	Caldo Müeller-Hinton
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAS	do inglês, <i>Chemical American Society Registry Number</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
CDC	do inglês, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHL	Cloranfenicol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPC	Enterobactérias Produtoras de Carbapenemases
ES	Extrato seco
ESBL	do inglês, <i>Extended-Spectrum Beta-Lactamase</i>

ESI	do inglês, <i>electrospray ionization</i>
H ₂ O UP	Água ultrapura
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
INT	Cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazólio
ISTs	Infecções Sexualmente Transmissíveis
LEVO	Levofloxacina
Log	Logaritmo
MDR	do inglês, <i>multi-drug resistant</i>
NCBI	do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PN	Produto natural
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PPGCF	Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
RAM	Resistência antimicrobiana
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>S. Choleraesuis</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Choleraesuis
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Enteritidis
SE	Solução-estoque
serovar.	Sorovariedade
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Typhimurium
SU	Solução de uso
subsp.	Subespécie
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
WHO	do inglês, <i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

Da	Dalton
EtOH	Etanol
g	Gramas
H ₂ O	Água
H ₂ O _d	Água destilada estéril
kHz	Quilohertz
MeOH	Metanol
mg	Miligramas
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
W	Watt
µg	Microgramas
µL	Microlitro
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	29
2.1	INFECÇÕES BACTERIANAS E MICRO-ORGANISMOS DE RELEVÂNCIA CLÍNICA: BREVE HISTÓRICO E CENÁRIO ATUAL.....	29
2.2	RESISTÊNCIA BACTERIANA: UM PROBLEMA GLOBAL DE SAÚDE PÚBLICA.....	34
2.3	CONTEXTUALIZAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL ESTUDADA.....	38
2.3.1	Família Rosaceae Juss. e suas subfamílias.....	39
2.3.2	Gênero <i>Rubus</i> L.....	40
2.3.2.1	A espécie <i>Rubus grandifolius</i> Lowe.....	43
2.3.3	COMPOSTOS FENÓLICOS: ORIGEM E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	49
2.3.3.1	Não Flavonoides.....	52
2.3.3.2	Flavonoides.....	53
3	OBJETIVOS.....	55
3.1	GERAL.....	55
3.2	ESPECÍFICOS.....	55
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	56
4.1.1	Coleta e processamento do material vegetal.....	57
4.2	PROCESSO DE EXTRAÇÃO.....	57
4.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS METANÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR <i>ELECTROSPRAY</i> (CLAE-DAD-ESI/EM ⁿ).....	58
4.3.1	Preparo da amostra.....	58
4.3.2	Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com ionização por <i>Electrospray</i> (CLAE-DAD-ESI/EMⁿ).....	58
4.4	INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA <i>in vitro</i> DOS EXTRATOS DE PLANTAS PROCEDENTES DA ILHA DA MADEIRA E AÇORES.....	59

4.4.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	66
4.4.2	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático.....	72
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
5.1	INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA <i>in vitro</i> DOS EXTRATOS METANÓLICOS OBTIDOS DE DIFERENTES PARTES DE PLANTAS PROCEDENTES DA ILHA DA MADEIRA E AÇORES, PORTUGAL.....	73
5.2	INVESTIGAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE FOLHAS E FRUTOS DE <i>Rubus grandifolius</i> POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR <i>ELECTROSPRAY</i> (CLAEAD-ESI/EMn).....	80
5.2.1	Perfis cromatográficos dos extratos metanólicos das folhas e frutos de <i>Rubus grandifolius</i> no modo negativo de ionização.....	80
5.2.2	Perfis cromatográficos dos extratos metanólicos dos frutos de <i>Rubus grandifolius</i> no modo positivo de ionização.....	88
6	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS.....	93
	ANEXO A - Artigo publicado intitulado "Synthesis of arylfuran derivatives as potential antibacterial agents".....	104
	ANEXO B - Artigo publicado intitulado "Ambiente marinho e resistência bacteriana aos antimicrobianos: impacto à saúde humana".....	105
	APÊNDICE A - Resumo intitulado " <i>Polygonum hydropiperoides</i> Michx. (Polygonaceae Juss.): uma fonte natural de substâncias bioativas com efeito antibiótico" apresentado na forma de pôster no III Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas (SINCIFAR), 07 a 09 de novembro de 2018, Belo Horizonte (MG).....	106

1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas para o tratamento e cura de doenças constitui uma prática milenar (BALUNAS; KINGHORN, 2005; NEWMAN; CRAGG, 2020) sendo, posteriormente, acompanhada pelo emprego dos medicamentos fitoterápicos (MENDES et al., 2018). Segundo Mendes e colaboradores (2018), os relatos da utilização dos produtos naturais (PNs) [entidades químicas que se originam de plantas, bactérias, fungos ou organismos marinhos (KATZ; BALTZ, 2016)] pelo homem no combate de diversas enfermidades são primitivos, sendo o potencial terapêutico e a toxicidade empiricamente estabelecidos. Inicialmente, as preparações medicinais feitas a partir das espécies vegetais eram utilizadas em sua forma bruta como pós, chás, tinturas, entre outras; o conhecimento sobre a planta a ser utilizada, a parte da espécie vegetal mais apropriada, os métodos de conservação e as formas de aplicação foram transmitidos popularmente através da história (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Assim, tradicionalmente, as plantas e os animais vêm sendo historicamente utilizados como fonte de várias preparações medicinais (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015) de forma que, nas últimas décadas, o número de pesquisas envolvendo PNs vem aumentando em todo o mundo com o intuito de descobrir novas substâncias com potencial terapêutico (YI et al., 2017). Os PNs têm sido submetidos a ensaios clínicos com a expectativa de serem utilizados, por exemplo, como possíveis novos agentes antimicrobianos e antineoplásicos (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). De fato, a contribuição dos PNs e de seus derivados na obtenção de novos fármacos nas últimas cinco décadas (01/1981 a 09/2019) é notória, em especial na área anti-infecciosa, que se mostra dependente dessas substâncias (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Segundo dados publicados por Schanzenbach e colaboradores (2016), no início do século XX a expectativa média de vida da população nos Estados Unidos da América era de aproximadamente 46 anos para os homens e 48 anos para as mulheres devido, entre outras causas, às doenças infecciosas como pneumonia, gripe, tuberculose, infecções gastrointestinais e difteria. Estas foram as principais responsáveis pelas altas taxas de morbidade e mortalidade na população norte americana naquele momento (SCHANZENBACH; NUNN; BAUER, 2016). Durante este período, em que nada ou pouco se sabia sobre o caminho e prevenção de infecções, antibióticos e vacinação, por milhares de anos a humanidade foi torturada por enormes epidemias como sífilis, varíola, malária, tifo, febre amarela, lepra, tuberculose, gripe espanhola, cólera e peste, para citar apenas algumas (MOHR, 2016). Até mesmo pequenos

cortes ou ferimentos superficiais na pele poderiam trazer graves consequências e levar o indivíduo à morte e, à época, qualquer forma de cirurgia era muito arriscada (BARTON, 2017).

Em 1928, este cenário começou a se modificar com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, o que marcou o início da chamada revolução antibiótica ou "era de ouro" (do inglês, *golden era*) (O'NEILL, 2016). Em 1942, Ernst Boris Chain e Howard Walter Florey sintetizaram a primeira penicilina, a penicilina G, visando a produção em escala industrial desse primeiro antibiótico natural (AMINOV, 2017). O somatório das pesquisas de Fleming, Chain e Florey conferiu a eles o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1945 (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/summary/>, acesso em 16 set. 2019). Vale ressaltar que a descoberta de antibióticos no século XX foi considerada uma das conquistas médicas mais significativas de toda a história (WHO, 2017a).

De fato, desde sua introdução na prática clínica, os antibióticos não apenas salvaram milhões de vidas, mas também permitiram a realização de importantes procedimentos médicos invasivos (WHO, 2017a). Contudo, com a emergência e a disseminação da resistência antimicrobiana (RAM), em especial a antibacteriana, em todas as áreas geográficas do planeta, a eficácia terapêutica destes medicamentos que revolucionaram a saúde pública mundial foi colocada em risco (WHO, 2017a).

Bactérias resistentes a antibióticos estão se espalhando rápida e furtivamente pelo mundo e são uma preocupação cada vez maior para a saúde (KOULENTI et al., 2019). Estas bactérias causam infecções mais severas e menos responsivas aos tratamentos convencionais quando comparadas àquelas causadas por micro-organismos sensíveis. Este fato resulta no aumento da frequência de hospitalização, em internações por tempo prolongado, no aumento da duração da doença e na elevação da mortalidade (AIDARA-KANE et al., 2018).

A resistência é um fenômeno natural observado desde a introdução da penicilina na prática clínica nos anos de 1940 e é inevitável que se desenvolva para todos os antibióticos em algum momento (LOBANOVSKA; PILLA, 2017). Porém, o uso indevido ou excessivo de antibióticos vem acelerando o desenvolvimento deste evento (WHO, 2017a). As bactérias podem adquirir resistência devido às mutações nos genes que expressam proteínas e naqueles expressos em resposta aos estímulos ambientais. Alternativamente, micro-organismos do ambiente abrigam genes de resistência, representando importantes reservatórios desses elementos genéticos, que podem ser transmitidos horizontalmente às bactérias patogênicas (ZAKERI; LU, 2013). Além da resistência aos antibióticos disponíveis no mercado, as bactérias vêm adquirindo genes de virulência que têm transformado micro-organismos de ocorrência comum em patógenos invasivos e produtores de toxinas (FERNANDES, 2006). Em recente

revisão, Cepas e Soto (2020), estudaram a relação entre as bactérias Gram-negativas mais importantes (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) levando em consideração dois pontos de vista: i) o efeito que a aquisição de resistência tem sobre a virulência; e (ii) a co-seleção de resistência e virulência.

Neste cenário, a RAM inevitavelmente nos conduzirá a um momento em que a eficácia terapêutica de todos os antibióticos disponíveis estará prejudicada, levando a um aumento da morbimortalidade associada às doenças infecciosas (RAINA et al., 2019). Além disso, sem antibióticos eficazes, o sucesso das principais intervenções médicas e cirúrgicas ficará comprometido e aumentará a incapacidade devido a complicações em procedimentos como transplante de órgãos e quimioterapia de câncer (RAINA et al., 2019), ou tornará até mesmo doenças menores, cirurgia de rotina ou parto muito arriscados no futuro (FRID-NIELSEN; RUBIN; BAEKKESKOV, 2019).

Acredita-se que esta iminente crise de resistência aos antibióticos esteja perturbando a consciência de médicos, pesquisadores, legisladores, políticos e população em geral. Como exposto, a evolução e a distribuição generalizada de elementos de resistência a antibióticos em bactérias patogênicas tornaram as doenças que antes eram facilmente tratáveis, novamente mortais. Afinal, infelizmente este aumento da escala global de resistência não foi acompanhado pela descoberta de novos antibióticos (BROWN; WRIGHT, 2016).

Assim, sob o olhar da pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos, as plantas medicinais, uma das principais fontes de PNs, possuem potencial significativo para o desenvolvimento de novas terapias antibacterianas e tratamentos coadjuvantes e têm sido reavaliadas como modelos para novos agentes antibacterianos (MAHADY, 2005). Vale ressaltar que 30% a 50% dos produtos farmacêuticos e nutracêuticos atuais são derivados de plantas (ANAND et al., 2019).

Neste contexto, o Brasil é notoriamente um país privilegiado, pois possui a maior biodiversidade do mundo, contando com mais de 45.000 espécies de plantas superiores, o que representa 22% do total existente no planeta (DUTRA et al., 2016). Esta grande e expressiva biodiversidade nos remete ao momento histórico onde o território brasileiro era habitado pelos índios. Desde aquela época, esses nativos já faziam uso das ervas medicinais nos rituais praticados pelos "pajés". Tradicionalmente, todo conhecimento adquirido dos poderes das ervas medicinais, incluindo benefícios e riscos de sua utilização, era repassado de geração em geração. Posteriormente, este conhecimento foi compartilhado com os portugueses, nossos colonizadores europeus (BRAGA, 2011). O conhecimento adquirido em solo brasileiro pelos portugueses, somado àquele trazido da Europa, foi importante para incentivar os estudos e a

utilização das ervas. Os colonizadores europeus realizavam comparações entre as ervas conhecidas na Europa e as nativas do Brasil. Em seguida, a cultura africana foi agregada a este conhecimento, uma vez que os escravos também utilizavam ervas medicinais para diversas finalidades. A união do conhecimento destas três ricas culturas se traduziria na base do conhecimento do povo brasileiro sobre ervas medicinais (BRAGA, 2011).

Com base no exposto, nosso grupo de pesquisa estabeleceu um acordo de cooperação acadêmico internacional com a Profa. Dra. Paula Cristina Machado Ferreira Castilho, do Centro de Química da Madeira da Universidade da Madeira, Funchal, Portugal. A formalização desta parceria teve o intuito de ampliar a abordagem etnofarmacológica de nossas investigações, extrapolando-a para nossas raízes colonizadoras. Para tanto, inicialmente, vinte extratos metanólicos obtidos de diferentes espécies vegetais procedentes da Ilha da Madeira e Açores, Portugal, foram submetidos a uma triagem da atividade antibacteriana *in vitro* para seleção do mais efetivo. Após, o presente estudo teve como objetivo investigar a composição química e a atividade antibacteriana *in vitro* de extratos metanólicos obtidos de folhas e frutos de *Rubus grandifolius* Lowe, espécie vegetal observada exclusivamente no Arquipélago da Madeira.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INFECÇÕES BACTERIANAS E MICRO-ORGANISMOS DE RELEVÂNCIA CLÍNICA: BREVE HISTÓRICO E CENÁRIO ATUAL

As doenças infecciosas, com ênfase nas de etiologia bacteriana, constituem um dos principais problemas globais e dinâmicos de saúde pública, estando intimamente associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (FURUSE, 2019; MADIGAN et al., 2016).

As bactérias são micro-organismos que estão presentes em qualquer lugar da Terra, sendo capazes de dar suporte à vida e, por isso, chamados de seres ubiqüitários ou ubíquos, ou seja, aqueles capazes de se adaptar aos mais variados ambientes e condições de vida. Essa plasticidade, entre diversas outras características, justifica a importância destes micro-organismos em diversas áreas como na agricultura, nutrição, produção de energia e medicamentos, entre outras aplicações (MADIGAN et al., 2016). Porém, embora as bactérias possam trazer diversos benefícios à população e ao meio ambiente, elas também podem ser responsáveis por um amplo espectro de doenças infecciosas, principalmente as multidrogarresistentes (MDRs), sendo responsabilizadas pelo aumento do número de internações e permanência hospitalar prolongada, o que resulta em maiores custos com assistência médica e em um alto índice de morbimortalidade a cada ano (RELLO; PARISELLA; PEREZ, 2019; TANDON et al., 2017).

Em 1928, com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming e o progresso científico que se seguiu durante o século XX com a descrição de diversas outras substâncias com atividade antibacteriana, imaginava-se que as doenças de etiologia bacteriana fossem facilmente controladas (LEWIS, 2013; ZAMAN et al., 2017). Naquele momento histórico, os antibióticos eram vistos como "balas mágicas" ou "drogas milagrosas", pois eram capazes de direcionar seus efeitos seletivamente para os micro-organismos, que eram os responsáveis por causar as doenças, de forma que o hospedeiro e suas células não eram afetados (AMINOV, 2017; ZAMAN et al., 2017). O período compreendido entre os anos de 1950 e 1970 ficou marcado como a "era de ouro" para a descoberta de novas classes de antibióticos (Tabela 1). Contudo, naquela oportunidade, Fleming já alertava sobre a potencial resistência desenvolvida pelos micro-organismos devido ao uso incorreto destas substâncias (ZAMAN et al., 2017).

Tabela 1 - Classe química, função inibida, efeito antibacteriano e exemplo de antibióticos descobertos na "era de ouro"

Classe Química	Função Inibida	Efeito Antibacteriano	Exemplo
Sulfonamidas*	Síntese do folato	Bacteriostático	Sulfonamida
β -lactâmicos ^φ	Síntese da parede celular	Bactericida	Penicilinas Cefalosporinas Carbapenêmicos
Aminoglicosídeos ^φ	Síntese proteica	Bactericida	Estreptomicina Neomicina
Tetraciclínas ^φ	Síntese proteica	Bacteriostático	Tetraciclina Doxiciclina
Cloranfenicóis ^φ	Síntese proteica	Bacteriostático	Cloranfenicol
Macrolídeos ^φ	Síntese proteica	Bacteriostático	Eritromicina Claritromicina
Glicopeptídeos ^φ	Síntese da parede celular	Bactericida	Vancomicina Teicoplanina
Oxazolidinonas*	Síntese proteica	Bacteriostático	Linezolida
Ansamícinas ^φ	Síntese de RNA	Bactericida	Rifamicina
Quinolonas*	Síntese de DNA	Bactericida	Ciprofloxacina
Streptograminas ^φ	Síntese proteica	Bactericida	Pristinamicina

*Síntese química / ^φProduto natural

Fonte: Adaptado de Brown e Wright (2016).

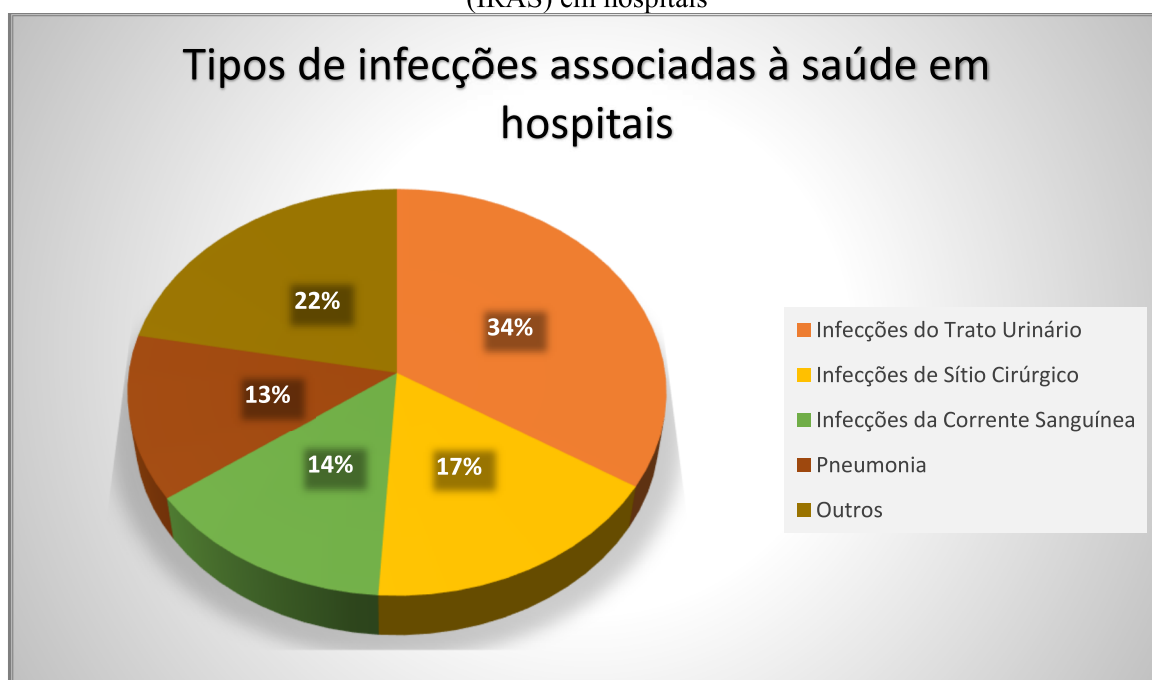
Desta forma, embora o surgimento dos antibióticos tenha representado um grande avanço para a medicina à época, desde os meados do século XX até os dias atuais, as doenças infecciosas, que acometem pacientes comunitários ou hospitalizados ou que estejam recebendo assistência à saúde (por exemplo, *home care*), continuam sendo importantes causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, se caracterizando como um dos principais problemas de saúde pública (ANCILLOTTI et al., 2018; BOUZA et al., 2019; FURUSE, 2019).

Neste contexto, as infecções nosocomiais, anteriormente denominadas hospitalares e renomeadas como infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), merecem destaque. As IRAS são aquelas adquiridas durante o recebimento de assistência à saúde (realização de procedimentos necessários à monitorização e ao tratamento) e que não estavam presentes no momento da admissão do paciente. Elas podem ocorrer em diferentes áreas da prestação de assistência à saúde como em hospitais, instalações de cuidados de longo prazo e ambientes ambulatoriais e podem aparecer após a alta. As IRAS também incluem infecções ocupacionais que podem acometer a equipe de saúde (ZIKORA; ZAHRA, 2021).

Como as IRAS ocorrem durante a internação, geralmente causam hospitalização prolongada, incapacidade e ônus econômico (KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017). As IRAS

estão diretamente relacionadas a procedimentos invasivos e cirurgia e ao uso de dispositivos médicos internos e protéticos, podendo estabelecer infecções de corrente sanguínea, do trato urinário, de sítio cirúrgico, de trato respiratório, de pele e tecidos moles e do trato intestinal (Figura 1) (BAVISKAR et al., 2019; BOUZA et al., 2019; KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017; ZIKORA; ZAHRA, 2021).

Figura 1 - Imagem gráfica do percentual dos tipos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) em hospitais



Fonte: Adaptado de <https://www.uspharmacist.com/article/prevalence-of-health-care-associated-infections>, acesso em 29 jun 2021.

Considerando os pacientes hospitalizados, os indivíduos mais susceptíveis as IRAS são aqueles admitidos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), de grandes queimados, de transplantes de órgãos e neonatologia (KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017), sendo a maior incidência observada em pacientes internados em UTI (BAVISKAR et al., 2019).

Em termos de etiologia, diferentes micro-organismos tais como bactérias, fungos e vírus são responsáveis pelas IRAS (ZIKORA; ZAHRA, 2021). No geral, as bactérias são os patógenos mais comuns, seguidas por fungos e vírus (ZIKORA; ZAHRA, 2021). Em 2011, o resultado de grandes estudos realizados pela Alemanha, França e Itália envolvendo 13954 isolados demonstrou que os patógenos mais frequentemente relatados em infecções adquiridas em UTI eram *Staphylococcus aureus* (21,8%), *Enterobacteriaceae* (20,2%), *Pseudomonas spp.*

(17,2%), *Enterococcus* spp. (10,0%), *Escherichia coli* (9,1%), *Candida* spp. (8,8%), estafilococos coagulase-negativos (7,0%) e *Acinetobacter* spp. (5,1%) (WHO, 2011).

No Brasil, apesar de não dispormos de informações atualizadas sobre os principais agentes etiológicos de IRAS, as Tabelas 2 e 3 apresentam dados obtidos em 2004 sobre os patógenos mais frequentemente isolados, sítios mais comumente infectados, procedimentos médicos realizados e infecções diagnosticadas (BRASIL, 2004), que estão alinhados com os achados da literatura expostos anteriormente.

Tabela 2 - Principais agentes etiológicos de infecções relacionadas à assistência à saúde e respectivos sítios de isolamento no Brasil em 2004

Patógeno	Sítios comuns de isolamento do patógeno
Bactérias Gram negativas	
<i>Escherichia coli</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Pseudomonas</i> sp	Trato urinário, trato respiratório, queimaduras
<i>Klebsiella</i> sp	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Proteus</i> sp	Trato urinário, feridas cirúrgicas
<i>Enterobacter</i> sp	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Serratia</i> sp	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
Bactérias Gram positivas	
<i>Streptococcus</i> sp	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
Fungo	
<i>Candida albicans</i>	Trato urinário, sangue
outros	Trato urinário, sangue, trato respiratório

Fonte: Adaptado de Brasil (2004).

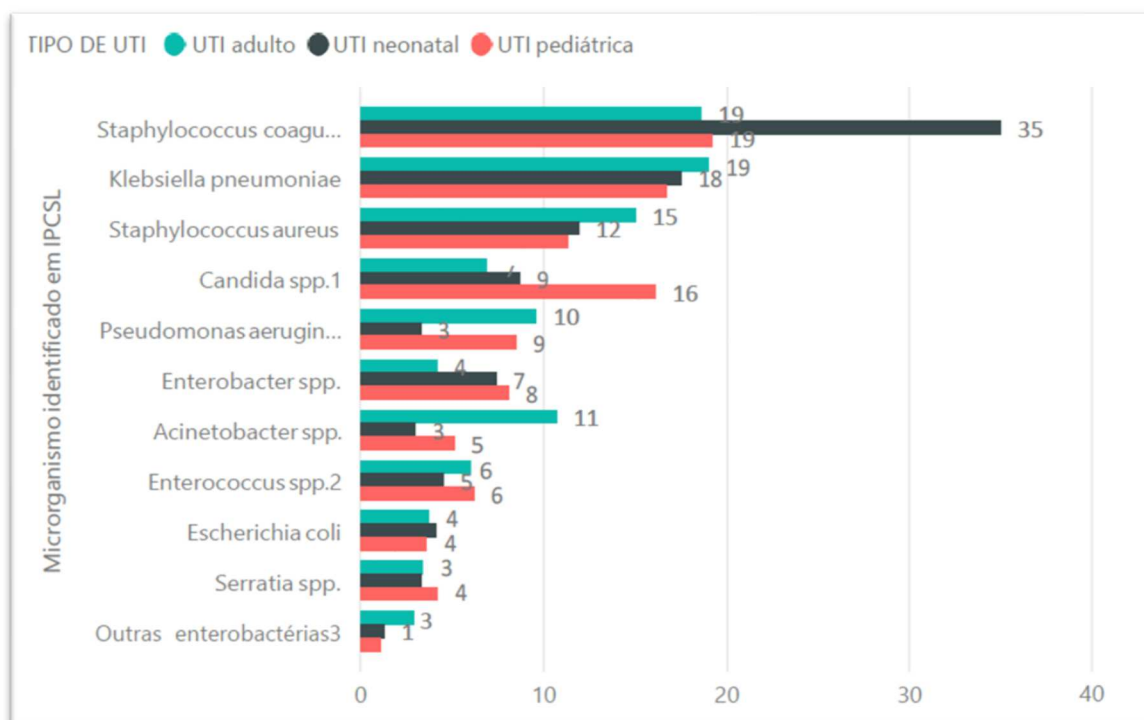
Tabela 3 - Principais procedimentos médicos, infecções relacionadas à assistência à saúde e agentes etiológicos no Brasil em 2004

Procedimento	Doença	Patógeno
Cateterização urinária	Cistite	Bacilos gram negativos, enterococos
Cirurgia	Feridas, septicemia	<i>Staphylococcus</i> , bacilo gram negativos, bacteróides
Terapia intravenosa	Infecção no local de injeção, septicemia	<i>Staphylococcus</i> , <i>klebsiella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Candida</i>
Intubação respiratória	pneumonia	<i>Pseudomonas</i> , <i>klebsiella</i> , <i>Serratia</i>
Diálise renal	Sepse, reação pirogênica	Vírus da hepatite B, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas</i>

Fonte: Adaptado de Brasil (2004).

Em 2017, um levantamento dos micro-organismos notificados à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como agentes etiológicos de infecções primárias da corrente sanguínea em pacientes em uso de cateter venoso central hospitalizados em UTI adulto, neonatal e pediátrica, um dos tipos mais comuns de IRAS, revelou *Staphylococcus* coagulase negativo, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *Candida* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp., *E. coli*, *Serratia* spp. e outras enterobactérias como os mais frequentemente isolados, conforme ilustra a Figura 2 (BRASIL, 2017).

Figura 2 - Percentual de distribuição dos micro-organismos notificados como agentes etiológicos de Infecções Primárias da Corrente Sanguínea (IPCS) em pacientes em uso de Cateter Venoso Central (CVC) hospitalizados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) adulto, neonatal e pediátrica no Brasil em 2017



Fonte: Brasil (2017).

Em relação à taxa geral de ocorrência de IRAS, uma revisão sistemática da literatura publicada pela OMS reportou que as faixas de percentuais observadas no período de 1995 a 2010 em países em desenvolvimento foram mais altas do que naqueles desenvolvidos, com valores variando de 5,75% a 19,10% e ~ 4% a 12%, respectivamente (WHO, 2011). No Brasil, a prevalência de IRAS obtida neste período de estudo foi de 14% (WHO, 2011). Vale ressaltar que se acredita que os casos de IRAS sejam agravados pelo envolvimento de patógenos resistentes, especialmente os MDRs (CASSINI et al., 2019).

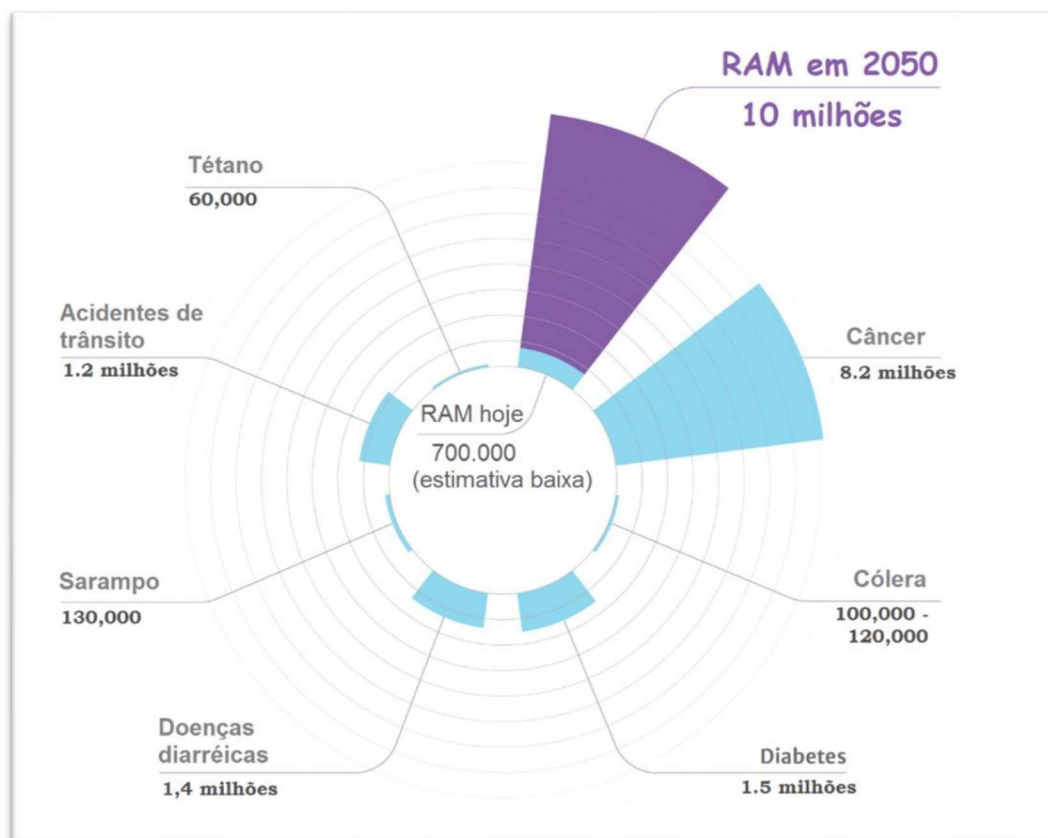
2.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA: UM PROBLEMA GLOBAL DE SAÚDE PÚBLICA

A RAM é um fenômeno antigo, natural e inevitável a todos os antibióticos em um dado momento (LOBANOVSKA; PILLA, 2017), levando a OMS a identificá-la como um problema global, emergente e sem paralelo para a saúde pública, animal e ambiental (WHO, 2020). Esta questão é tão atual que, em tempos de pandemia de COVID-19, Nieuwlaat e colaboradores (2020) descreveram que a pandemia ajuda a ilustrar o impacto potencial de longo prazo da RAM, que é menos agudo, mas não menos crucial. Segundo esses autores, os pesquisadores devem começar prontamente a coletar dados para medir o impacto das políticas e programas atuais da COVID-19 na RAM (NIEUWLAAT et al., 2020).

Desta forma, a RAM é vista pelas principais entidades reguladoras, econômicas e políticas do mundo como um dos desafios fundamentais de saúde global do século XXI. Há um consenso científico por parte destes órgãos que a RAM não pode mais ser tratada observando apenas os problemas inerentes aos serviços de saúde uma vez que a maioria dos ecossistemas e as características culturais e socioeconômicas de uma determinada população podem contribuir para seu surgimento, aquisição e disseminação (HERNANDO-AMADO et al., 2019).

Em 2016, a compreensão global e complexa do fenômeno da RAM conduziu às estimativas alarmantes como a realizada por O'Neill. No relato efetuado por esse autor, observa-se que, até o ano de 2016, as infecções por micro-organismos resistentes foram responsáveis por cerca de 700.000 mortes por ano em todo o mundo. Porém, conforme alerta O'Neill, se nenhuma atitude for tomada, inclusive com a adoção de medidas políticas de intervenção, o número de mortes estimadas atribuídas à RAM chegará a 10 milhões em 2050, superando a previsão de óbitos por câncer (8,2 milhões) e por diabetes (1,5 milhões), entre outras causas importantes, com perdas econômicas na ordem de 100 trilhões de dólares (Figura 3) (O'NEILL, 2016).

Figura 3 - Imagem ilustrativa da estimativa das principais causas de morte no mundo em 2050



RAM: resistência antimicrobiana.

Fonte: Adaptado de O'Neill (2016).

Em relação aos micro-organismos, eles podem apresentar, em determinado momento, dois tipos de resistência: 1) resistência intrínseca ou inata ou primária, que ocorre quando a espécie ou gênero bacteriano apresenta uma resistência a um antibiótico específico ou classe de antibióticos. De modo geral, o micro-organismo não possui o sítio de ligação ou esse se encontra inacessível para que o antibiótico exerça sua atividade. Pode ser devido também à presença de sistemas de secreção ou produção de enzimas de inativação específicas em certas bactérias, como a β -lactamase tipo AmpC em *Enterobacteriaceae*; e 2) resistência adquirida, onde ocorre a aquisição, por uma cepa bacteriana específica, de genes de resistência, principalmente elementos genéticos móveis, ou por meio de mutações nos genes cromossômicos. As mutações que regulam positivamente a expressão de sistemas transportadores de múltiplos agentes antimicrobianos também estão inseridas nesta categoria. Neste tipo de resistência, três mecanismos se destacam, a saber: (a) diminuição da concentração intracelular do antibiótico por inativação enzimática, resultando na desintegração ou modificação química desse fármaco; (b) diminuição do influxo e/ou aumento do efluxo do antibiótico, resultando na redução de sua concentração intracelular; e (c) modificação dos sítios

de ligação dos antibióticos por mutação, modificação química, proteção ou substituição de sítios de ligação sensíveis por estruturas resistentes alternativas (VAN DUIJKEREN et al., 2018). Em 2005, Alanis já descrevia que as bactérias tinham desenvolvido resistência a todas as diferentes classes de antibióticos descobertas até aquele momento pela presença de um ou mais mecanismos (ALANIS, 2005).

Neste cenário de franca ascensão da RAM potencializada pelos inúmeros casos de infecções causadas por micro-organismos MDRs, a OMS buscou identificar quais seriam as bactérias resistentes mais importantes em nível global, para as quais haveria uma necessidade urgente de novos antibióticos ou de estratégias terapêuticas alternativas. Assim, esta organização publicou uma lista de patógenos prioritários para guiar a pesquisa, a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos, dividindo-os em três níveis de prioridade, Crítica (1), Alta (2) e Média (3), conforme mostra a Tabela 4 (WHO, 2017c).

Tabela 4 - Lista de patógenos prioritários para guiar a pesquisa, a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos publicada pela Organização Mundial da Saúde em 2017

Prioridade 1 CRÍTICA	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente à carbapenema • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente à carbapenema • Enterobacteriaceae* resistente à carbapenema, resistente às cefalosporinas de 3ª geração
Prioridade 2 ALTA	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterococcus faecium</i> resistente à vancomicina • <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina, com sensibilidade intermediária e resistente à vancomicina • <i>Helicobacter pylori</i> resistente à claritromicina • <i>Campylobacter</i> resistente à fluoroquinolona • <i>Salmonella</i> spp. resistente à fluoroquinolona • <i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente às cefalosporinas de 3ª geração, resistente à fluoroquinolona
Prioridade 3 MÉDIA	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus pneumoniae</i> sem sensibilidade à penicilina • <i>Haemophilus influenzae</i> resistente à ampicilina • <i>Shigella</i> spp. resistente à fluoroquinolona

* Enterobacteriaceae inclui: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Morganella* spp. Vale ressaltar que, apesar da ordem *Enterobacteriales* ter sofrido profundas modificações em 2016, com a alteração de sua nomenclatura para *Enterobacterales* e a divisão da família *Enterobacteriaceae* (deslocamento da *Serratia* spp. para a *Yersiniaceae* e *Morganella* spp., *Proteus* spp. e *Providencia* spp. para a *Morganellaceae*) (ADEOLU et al., 2016), foram mantidos os dados como publicados pela OMS.

Fonte: Adaptado de WHO (2017c).

Adicionalmente, a emergência e a disseminação de novos mecanismos de resistência têm reduzido cada vez mais as chances de sucesso no tratamento de doenças infecciosas. Desta forma, para evitar o que a OMS denominou de "era pós-antibiótica", onde infecções que antes

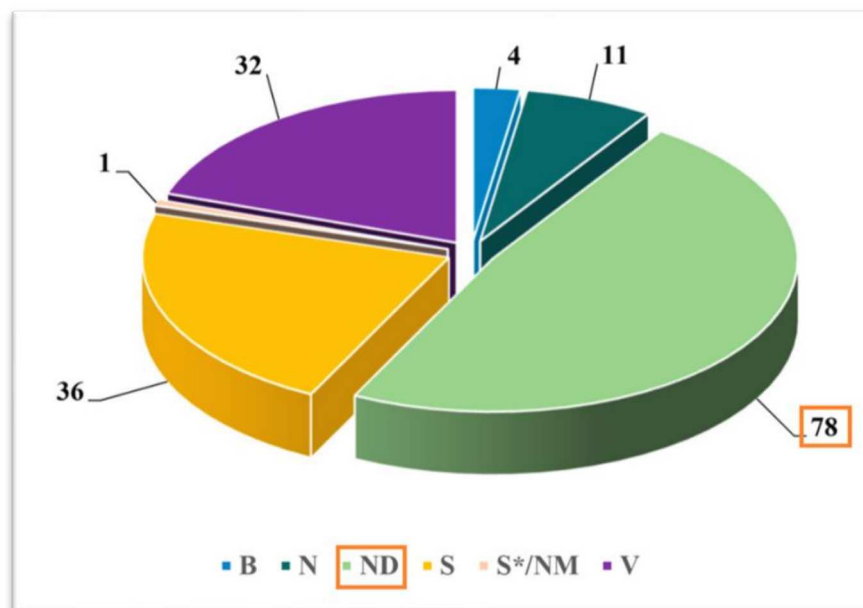
eram facilmente tratáveis voltaram a ser fatais para a população por terem se tornado "intratáveis", uma mudança de comportamento em nível mundial se fez urgente (WHO, 2017b).

Em contraste ao crescimento global da RAM, notou-se a dificuldade em descobrir e/ou desenvolver novos antibióticos nas últimas décadas. Conforme relatado por Silver (2011), os desafios para a descoberta e/ou desenvolvimento de antibióticos mantiveram a produção de novas classes desses fármacos em níveis extremamente baixos nos últimos 25 anos, embora programas com esses propósitos já existissem em grandes e pequenas empresas farmacêuticas bem como em laboratórios acadêmicos durante esse período. Segundo dados levantados por este autor, não houve descobertas bem-sucedidas de 1987 a 2011, período investigado por ele (SILVER, 2011).

Somente após uma década (2011 a 2021), Theuretzbacher e colaboradores (2020) descreveram que os agentes antibacterianos em desenvolvimento clínico, principalmente por pequenas empresas, têm sido predominantemente derivados de classes de antibióticos já existentes que foram selecionados para abordar mecanismos de resistência classe-específicos cujos determinantes foram estabelecidos no momento de suas descobertas. Muitos desses agentes visam os patógenos prioritários resistentes aos antibióticos listados pela OMS, incluindo bactérias Gram-negativas classificadas como prioridade Crítica (1) (Tabela 4), a saber: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Enterobacterales*, principalmente representantes da família *Enterobacteriaceae*, resistentes aos carbapenêmicos. De fato, no arsenal terapêutico disponível atualmente, somente a Afabicina se trata de um antibiótico inovador visto que possui um novo mecanismo de ação, atuando sobre a FabI (enzima enoil-acil redutase que atua sobre a proteína transportadora envolvida na biossíntese de ácidos graxos essenciais) (THEURETZBACHER, 2017). Com exceção de Afabicina, outros cinco "novos" antibióticos disponibilizados desde 2010 correspondem a três combinações (ceftolozane/tazobactam, ceftazidima/avibactam e meropenem/vaborbactam), um derivado sintético da classe das tetraciclinas halogenadas (plazomicina) e um aminoglicosídeo de nova geração (eravaciclina) foram aprovados para tratar bactérias Gram-negativas MDRs (KOULENTI et al., 2019).

Contudo, Newman e Cragg (2020) demonstraram a contribuição dos PNs e de seus derivados na obtenção de novos fármacos nas últimas cinco décadas (01/1981 a 09/2019) e reportaram, conforme ilustra a Figura 4, que a área anti-infecciosa é dependente dessas substâncias. Pela análise dessa Figura, observamos que os derivados de PNs (78) se constituíram na principal fonte de novos antibióticos (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Figura 4 - Imagem gráfica do nº de fontes de novos antibióticos no período de janeiro de 1981 a setembro de 2019



B: macromolécula biológica; N: produto natural inalterado; ND: derivado de produto natural; S: substância sintética; S*/NM: substância sintética (farmacóforo PN) / similar PN; e V: vacina.

Fonte: Adaptado de Newman e Cragg (2020).

Vale lembrar que as plantas medicinais, uma das principais fontes de PNs, possuem um potencial significativo para o desenvolvimento de novas terapias antibacterianas e tratamentos adjuvantes e têm sido reavaliadas como modelos para antibióticos inovadores (ANAND et al., 2019; MAHADY, 2005). Uma recente revisão publicada por Anand e colaboradores (2019) está centrada nos diversos efeitos e na eficácia de compostos à base de plantas para o controle do desenvolvimento de micro-organismos MDRs e espera inspirar pesquisas com espécies vegetais inexploradas com o objetivo de identificar novos antibióticos para benefícios à saúde global.

2.3 CONTEXTUALIZAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL ESTUDADA

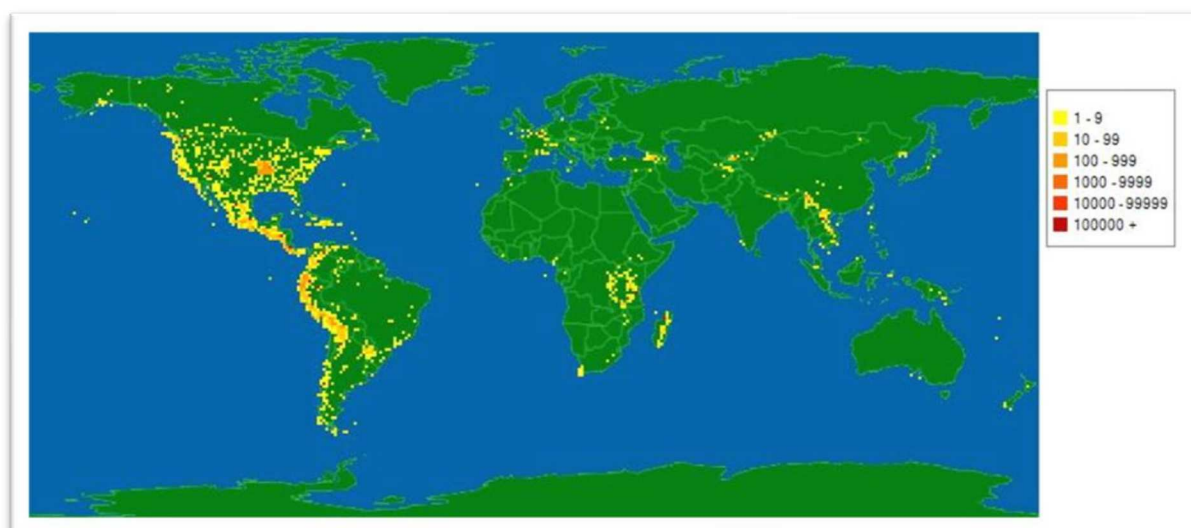
A etnofarmacologia das ilhas da Madeira é extremamente interessante pelas características culturais e biogeográficas dessa região, que a tornam um centro de diversidade de plantas medicinais (riqueza da flora endêmica, isolamento geográfico no oceano Atlântico, influências transculturais e abundância de curandeiras locais no passado) (RIVERA; OBÓN, 1995). Entre as espécies vegetais disponíveis, encontram-se exemplares da família Rosaceae, que será apresentada a seguir.

2.3.1 Família Rosaceae Juss. e suas subfamílias

Rosaceae é uma das maiores e mais diversificadas famílias de angiospermas, possuindo uma variedade de plantas que inclui muitos cultivos economicamente valiosos (terceira mais importante em regiões temperadas), que fornecem benefícios nutricionais e medicinais para o homem, inclusive muitas espécies frutíferas, tais como maçãs (*Malus pumila* Mill.); peras (*Pyrus* spp.); frutos de caroço, incluindo pêssegos (*Prunus persica*) e cerejas doces (*Prunus avium*); numerosas espécies ornamentais, incluindo rosas (*Rosa* spp.), cinza de montanha (*Sorbus aucuparia*) e cascas (*Physocarpus opulifolius*); e espécies de frutos macios como morango (*Fragaria x ananassa*), framboesa (*Rubus idaeus*) e amora (*Rubus* spp.), entre várias outras (LO; DONOGHUE, 2012; LONGHI et al., 2014; SOUNDARARAJAN; WON; KIM, 2019; ZAREI; ERFANI-MOGHADAM; MOZAFFARI, 2017; ZHONG et al., 2015).

Em termos de distribuição geográfica, a família Rosaceae é cosmopolita, sendo encontrada em todos os continentes, mas com maior frequência na América do Norte, com presença particularmente diversa nas florestas temperadas do hemisfério norte, nas quais os membros lenhosos da Rosaceae são importantes árvores florestais, propiciando *habitats* e alimentos para pássaros, mamíferos e outros animais (HUMMER; JANICK, 2009; TRÓPICOS, 2019) (Figura 5).

Figura 5 - Mapa ilustrativo da distribuição geográfica mundial de espécies de Rosaceae



Fonte: (<https://www.tropicos.org/Name/42000176?tab=maps#>, acesso em 15 set 2021).

Esta família compreende 104 gêneros e 4828 espécies (THE PLANT LIST, 2019). Convencionalmente, Rosaceae foi dividida em quatro subfamílias com base nos tipos de frutos, como Rosoideae, Amygdaloideae/Prunoideae, Spiraeoideae e Maloideae/Pomoideae (POTTER

et al., 2002). Posteriormente, análises filogenéticas de Rosaceae baseadas na combinação de dados das sequências do *loci* nuclear e cloroplástico reorganizaram essa família em três subfamílias, Rosoideae, Dryadoideae e Spiraeoideae (POTTER et al., 2007). Entre elas, destaca-se a Rosoideae, que engloba, entre outros gêneros, o *Rubus*, que possui diversas espécies economicamente importantes (POTTER et al. 2007; ZORRILLA-FONTANESI et al., 2011).

Como descrito anteriormente, apesar de cosmopolita, Rosaceae é pouco representada nos trópicos dada a sua predileção pelo hemisfério norte (Figura 5), não sendo endêmica no Brasil. Porém, conforme ilustra a Figura 6, são encontradas espécies vegetais nativas nas cinco regiões de nosso país (FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, 2019).

Figura 6 - Mapa ilustrativo da distribuição geográfica no Brasil de espécies de Rosaceae



As áreas de cores distintas sinalizadas no mapa representam a distribuição geográfica no Brasil de espécies da família Rosaceae.

Fonte: (<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB209>, acesso em 15 set 2021).

2.3.2 Gênero *Rubus* L.

Entre os 104 gêneros pertencentes à família Rosaceae, observa-se o *Rubus* L., subfamília Rosoideae, tribo Potentilleae, amplamente distribuído em todo o mundo, especialmente nas regiões temperadas do hemisfério norte. Este gênero compreende cerca de 700 espécies organizadas entre 12 a 15 subgêneros dependendo do botânico, algumas das quais são cultivadas em numerosas variedades como plantas industriais para comercialização como frutos

nutritivos e de sabor agradável (HUMMER, 2010; LI et al., 2015; ROCABADO et al., 2007). Estas diversas espécies de *Rubus* são nativas nos seis continentes (Américas, Europa, África, Ásia, Oceania e Antártida) e encontradas desde os topos das montanhas até as áreas costeiras ao nível do mar. Embora as framboesas e as amoras pretas (*Rubus caesius*) sejam comuns em regiões frias e temperadas do hemisfério norte (Figura 5), a maioria das espécies de *Rubus* é nativa das ilhas do Pacífico Sul (HUMMER, 2010).

Somado à capacidade nutritiva, uma série de espécies deste gênero é utilizada tradicionalmente em virtude de seu potencial terapêutico relacionado as suas variadas atividades biológicas, tais como antibacteriana, antiviral, anti-giardíase, antioxidante, anti-inflamatória, antirreumática, analgésica, antinociceptiva, ansiolítica, antiangiogênica, antigastropática, inibidora de mediadores da reabsorção óssea e no tratamento da espermatorreia, irritação da pele, enurese, diarreia, asma e doenças alérgicas (LI et al., 2015; SULTANA, 2018). De fato, a Medicina Tradicional Chinesa possui uma longa história de uso terapêutico dos frutos e de outras partes de *Rubus*, onde extratos das partes aéreas e/ou subterrâneas têm sido usadas no tratamento de infecções microbianas, diarreia, certos tipos de câncer, inflamações, lesões, diabetes *mellitus* e outros distúrbios (HAO; GU; XIAO, 2015).

Com o intuito de subsidiar cientificamente o uso popular de *Rubus* relacionando-o com suas propriedades biológicas, estudos foram e têm sido realizados com esse propósito. Assim, fontes etnofarmacológicas demonstraram que *R. caesius* (amora preta), *R. idaeus* (framboesa) e *Potentilla erecta* foram investigadas quanto a sua atividade antibacteriana na tentativa de justificar seu uso no tratamento de infecções microbianas (HAO; GU; XIAO, 2015; NIKITINA et al., 2007). *R. caesius*, por exemplo, mostrou ser uma fonte valiosa de polifenóis ativos bactericidas contra cepas de *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (NIKITINA et al., 2007).

Cho e colaboradores (2005) investigaram a presença de flavonóis glicosilados de vários genótipos de amora preta e mirtilo por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EMⁿ) associando a detecção desses fitoconstituintes à capacidade antioxidante diretamente relacionada às inflamações, lesões, câncer, infecções microbianas, entre outras, podendo, como agentes antioxidantes, minimizar esses processos (CHO et al., 2005).

Quanto ao uso de espécies de *Rubus* no tratamento e/ou prevenção de câncer e/ou outras doenças inflamatórias, Dai, Patel e Mumper (2007), ao caracterizarem quimicamente o extrato de *R. caesius* e investigarem suas atividades antiproliferativa e anti-inflamatória, obtiveram resultados sugestivos do potencial antioxidante, antiproliferativo e anti-inflamatório dessa

espécie. Para tanto, estes autores testaram extrato de *R. caesius* rico em antocianinas em cultura de células tumorais de cólon HT-29 (estágio inicial) *in vitro* e observaram que esse extrato foi capaz de inibir essas células (DAI; PATEL; MUMPER, 2007). Similarmente, Grochowski e colaboradores (2016) avaliaram os efeitos citotóxico e antioxidante de diferentes extratos e subfrações das folhas de *R. caesius* sobre duas linhagens celulares de câncer de cólon humano obtidas em dois estágios de progressão dessa doença, HT-29 (estágio inicial), anteriormente estudada por Dai, Patel e Mumper (2007), e SW-948 (estágio final). Estes autores descreveram que o extrato de folhas de *R. caesius* revelou uma atividade limitada sobre o crescimento dessas células tumorais, tanto na morfologia quanto no metabolismo. Ainda, a atividade antioxidante observada poderia estar conectada com a redução do crescimento das células tumorais estudadas (GROCHOWSKI et al., 2016). Sob a ótica das Práticas Alternativas e Complementares, Tas e colaboradores (2005) descreveram o uso de *R. caesius* como uma opção alternativa para o tratamento de câncer de mama, próstata e ovário de pacientes oncológicos turcos (TAS et al., 2005).

Em relação ao efeito de *Rubus* sobre a agregação plaquetária, Dudzinska e colaboradores (2016) investigaram a influência de extratos de folhas de *R. idaeus* e de *R. caesius* sobre a agregação plaquetária no sangue total e a comunicação entre plaquetas e neutrófilos. Os resultados obtidos por estes autores mostraram que os extratos testados modularam consideravelmente a reatividade das plaquetas, inibindo significativamente a agregação plaquetária (DUDZINSKA et al., 2016).

Como anteriormente mencionado, frutos e outras partes de *Rubus* têm sido tradicionalmente utilizadas no tratamento de diabetes e diarreia (HAO; GU; XIAO, 2015). Em 2017, Schädler e Dergatschewa demonstraram a atividade hipoglicemiante do extrato aquoso de folhas de *R. caesius* (500 mg/kg) em modelo de ratos com diabetes induzida por aloxana (SCHÄDLER; DERGATSCHEWA, 2017). Recentemente, o efeito hipoglicêmico de extratos hexânico, acetato de etila e metanólico de frutos de duas variedades de *Rubus rosifolius* (50 mg/kg de peso) foi estudado por meio do teste oral de tolerância à glicose em ratos machos *Sprague-Dawley* (RAMBARAN et al., 2020).

Embora nos tempos modernos as espécies de *Rubus* sejam cultivadas por seus frutos suculentos e ricos em vitaminas como as amoras e framboesas, que são consumidas como frutas frescas ou processadas em geleias, doces, laticínios e sucos, os povos antigos usavam toda a planta e suas partes. Caules, ramos, raízes, folhas e flores eram usados em decocções, infusões, emplastos, extrações de óleo ou no preparo de vinhos. As decocções dos ramos eram utilizadas para interromper a diarreia, para prevenir o corrimento vaginal e como um antídoto para picadas

de cobra (HUMMER, 2010). As folhas podiam ser mastigadas para fortalecer as gengivas, para tratar o prolapso dos olhos, condição que hoje é conhecida como "prolapso da glândula da terceira pálpebra" ou ainda "olhos de cereja", para tratar hemorroidas, entre outras aplicações. As flores trituradas com óleo eram utilizadas para reduzir as inflamações dos olhos e para esfriar as erupções cutâneas. Os frutos de *Rubus chingii* eram combinados com um tônico chinês chamado "fu pen zi" (tigela de frutas virada) e prescritos para infertilidade, impotência, dor lombar moderada, visão deficiente e para o tratamento de indivíduos com enurese noturna ou com micção frequente (HUMMER, 2010).

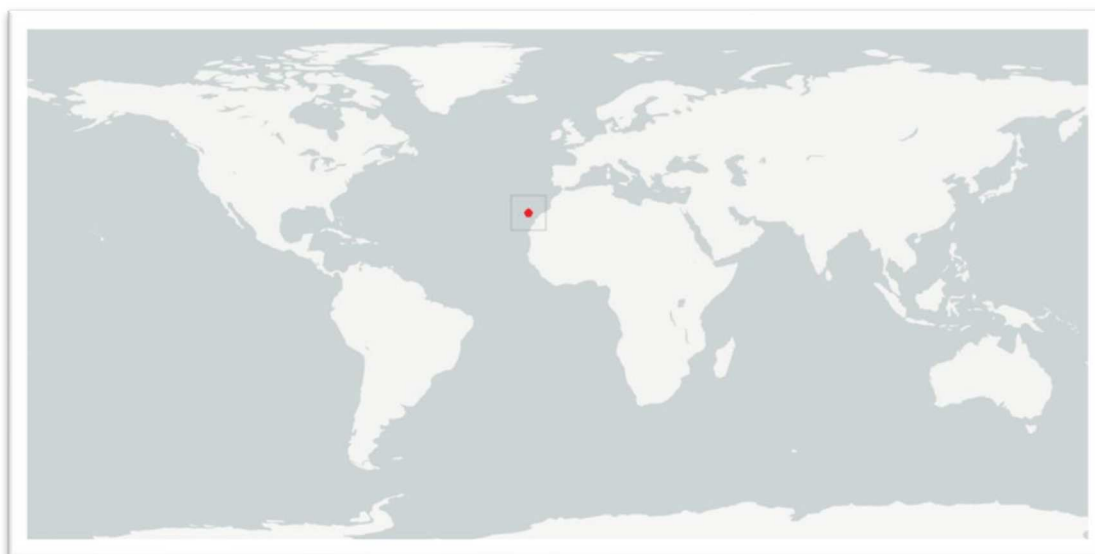
Quimicamente, desde 1970, mais de 340 compostos foram isolados de plantas deste gênero, destacando-se os derivados de alcaloides, fenólicos, terpenoides, glicosídeos, entre outros (HUMMER, 2010; LI et al., 2015). Dentre as classes de substâncias presentes em *Rubus*, os compostos fenólicos são os constituintes majoritários e mais ativos, divididos em flavonoides (polifenóis) e não flavonoides (fenóis simples ou ácidos). Dentro da classe dos flavonoides, potentes antioxidantes *in vitro*, incluem-se flavonas, isoflavonas, flavononas, catequinas e pigmentos vermelho, azul e púrpura conhecidos como antocianinas. Na classe dos não flavonoides estão os derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzoico (HUMMER, 2010; LI et al., 2015; SULTANA, 2018). Em síntese, são relatados fitoconstituintes de espécies de *Rubus* tais como antocianinas, flavonoides, ésteres de cafeoil, compostos fenólicos (elagitaninos), triterpenoides, e alguns outros compostos, sendo esse gênero considerado uma fonte rica e valiosa de compostos fenólicos e antocianinas (SULTANA, 2018).

Entre a diversidade de espécies que compõem este gênero, observa-se a *Rubus grandifolius* Lowe, encontrada exclusivamente no Arquipélago da Madeira, Portugal, sendo tradicional e frequentemente utilizada por moradores desse local (RIVERA; OBÓN, 1995).

2.3.2.1 A espécie *Rubus grandifolius* Lowe

A espécie *R. grandifolius* L., sinônimo de *Rubus serra* Soldano (<http://www.theplantlist.org/tp11.1/record/rjp-31000>, acesso em 15 set. 2021), é observada, conforme supramencionado, endemicamente no Arquipélago da Madeira, Portugal, que compreende as ilhas da Madeira, Porto Santo e um grupo de três outras ilhas, chamadas Desertas (RIVERA; OBÓN, 1995) (Figura 7).

Figura 7 - Mapa ilustrativo da distribuição geográfica global de *Rubus grandifolius*

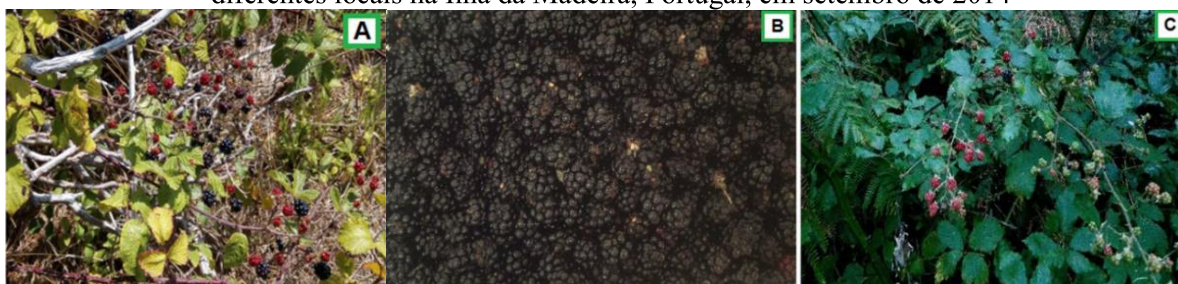


O ponto vermelho indica onde se encontra *R. grandifolius*.

Fonte: https://www.gbif.org/occurrence/map?country=PT&has_coordinate=true&has_geospatial_issue=false&taxon_key=2994930, acesso em 22 set. 2019.

Considerada, portanto, uma espécie vegetal rara, habita áreas úmidas e sombrias, sendo popularmente conhecida como amora silvestre (LLORENT-MARTÍNEZ; SPÍNOLA; CASTILHO, 2017) ou silvado (RIVERA; OBÓN, 1995) (Figura 8).

Figura 8 - Fotografia das folhas, frutos (amoras) e flores de *Rubus grandifolius* coletados em dois diferentes locais na Ilha da Madeira, Portugal, em setembro de 2014



(A) *R. grandifolius* observado no Pico do Areeiro, Ilha da Madeira, Portugal; (B) amoras; e (C) silvado colhido em Machico, Ilha da Madeira, Portugal.

Fonte: Pinto (2016).

Botanicamente, *R. grandifolius* possui caules resistentes e arqueados com espinhos, folhas ovadas-oblongas e numerosas flores brancas carregadas em uma grande panícula piramidal (SPÍNOLA et al., 2019), sendo seus frutos carnudos e cilíndricos, que se tornam pretos quando maduros (GOUVEIA-FILGUEIRA; CASTILHO, 2015).

Com relação à sua utilização, os frutos de *R. grandifolius* são empregados principalmente na indústria de alimentos para a produção de geleias, sucos e licores

(GOUVEIA-FILGUEIRA; CASTILHO, 2015). Sob a ótica da medicina tradicional, anteriormente, Rivera e Obón (1995) descreveram o uso de xarope de frutas para crianças e decocção de brotos tenros como adstringente. Gouveia-Filgueira e Castilho (2015) reportaram a sua utilização como remédio para diabetes, depurativo, diurético, tônico ou fortificante e no gargarejo para aliviar a dor de garganta, sendo ainda usadas no preparo de chás ou infusões alcoólicas.

Para subsidiar cientificamente um dos usos tradicionais da amora silvestre, Spínola e colaboradores (2019), utilizando modelos *in vitro*, avaliaram sua atividade visando o controle do diabetes tipo 2 e da obesidade. Neste estudo, extratos metanólicos das folhas e dos frutos de *R. grandifolius* foram analisados quanto ao efeito inibitório *in vitro* sobre enzimas digestivas ligadas ao diabetes tipo 2, assim como a atividade da aldose redutase e glicação de proteínas. A composição fenólica e as atividades antioxidante e citotóxica também foram determinadas. Como principal conclusão, Spínola e colaboradores (2019) reportaram que os extratos de amora silvestre demonstraram um potencial efeito benéfico no controle/monitoramento do diabetes *mellitus* tipo 2, validando seu uso na medicina popular.

Como já mencionado, outro reconhecido uso popular da amora silvestre está associado ao alívio da dor de garganta. Em termos de etiologia, a maioria dos casos de dor de garganta, geralmente representados por quadros de faringoamigdalites e cujos sinais e sintomas são dor, arranhão ou irritação na garganta, que geralmente piora quando o indivíduo engole, tem como agente etiológico mais frequente os vírus, como resfriado ou gripe, que se resolvem sozinhos; porém, podem ocorrer infecções bacterianas, que requerem tratamento com antibióticos para resolução do quadro infeccioso e prevenção de complicações (<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/sore-throat/symptoms-causes/syc-20351635>, acesso em 05 jul. 2021).

Considerando os processos infecciosos bacterianos, buscou-se na literatura publicações que pudessem subsidiar este uso tradicional de *R. grandifolius*. Para tanto, utilizou-se MEDLINE (do inglês, *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*), PUBMED [uma das bases de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)], *Scopus*, *Web of Science* (ISI *Web of Knowledge*), *Science Direct*, SCIELO (do inglês, *Scientific Electronic Library Online*) e Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), no período de 01 de agosto de 2018 a 29 de novembro de 2021, empregando como palavras-chaves aquelas que se mostraram pertinentes durante a elaboração da Dissertação, tais como "antimicrobial activity of *Rubus grandifolius*", "antibacterial activity of *Rubus grandifolius*", "antimicrobial activity of *Rubus serrae*" e

"antibacterial activity of *Rubus serrae*", não sendo encontrado nenhum resultado, o que corroborou a necessidade da realização da presente investigação.

As atividades biológicas descritas para *R. grandifolius* têm sido associadas à presença de diversas classes de metabólitos secundários, principalmente compostos fenólicos (GOUVEIA-FILGUEIRA; CASTILHO, 2015). No estudo de Gouveia-Filgueira e Castilho (2015), foi realizada uma análise qualitativa dos principais compostos fenólicos presentes nesta espécie, sendo identificadas mais de 40 substâncias na espécie selvagem (folhas, frutos e flores) nos quais os flavonoides, antocianinas, triterpenos glicosilados e formas conjugadas de ácidos hidroxicinâmicos foram os majoritários. Em relação à capacidade antioxidante, estes autores concluíram que as flores exibiram menor atividade quando comparadas aos frutos (GOUVEIA-FILGUEIRA; CASTILHO, 2015). Os compostos majoritários identificados anteriormente foram quantificados e as atividades antioxidante e citotóxica *in vitro* foram determinadas (SPÍNOLA et al., 2019). Neste estudo, as antocianinas foram os polifenóis mais abundantes nos frutos (\pm 54%), seguido pelos elagitaninos (37 - 39%), flavonóis (8 - 9%) e ácidos hidroxicinâmicos (AHCs) (0,7 - 0,9%). Nas folhas, os elagitaninos foram os compostos majoritários (44 - 49%), seguido pelos AHCs (28 - 38%), flavonóis (12 - 16%), flavanois (2 - 10%) e flavonas (0,28 - 0,32%) (SPÍNOLA et al., 2019).

A Tabela 5 apresenta os principais compostos fenólicos presentes nos extratos metanólicos de folhas e frutos de *R. grandifolius* descritos na literatura até o momento.

Tabela 5 - Dados dos principais polifenóis identificados em extratos metanólicos de *Rubus grandifolius* descritos na literatura

Substância	Classe	Nº Registro CAS	Parte da Planta	Referência
Cianidina- <i>O</i> -hexosídeo	Antocianina	-	Fruto	YOSHIMURA et al., 2012 SPÍNOLA et al., 2019
Cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	Antocianina	7084-24-4	Fruto	SPÍNOLA et al., 2019 PUBCHEM, 2019
Cianidina- <i>O</i> -pentosídeo	Antocianina	29761-24-8	Fruto	LATTI et al., 2009 YOSHIMURA et al., 2012
Cianidina- <i>O</i> -dioxalilglicosídeo	Antocianina	-	Fruto	CHEN et al., 2014
Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	Ácido hidroxicinâmico	327-97-9	Fruto Folha	CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005 PUBCHEM, 2019
Ácido cafeico- <i>O</i> -hexosídeo	Ácido hidroxicinâmico	24959-81-7	Folha	BUJOR et al., 2016 PUBCHEM, 2019
Derivado do ácido cafeico	Ácido hidroxicinâmico	-	Folha	SPÍNOLA et al., 2019
Ácido salvianólico	Ácido hidroxicinâmico	121521-90-2	Folha	SIMIRGIOTIS et al., 2012
Dímero de ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	Ácido hidroxicinâmico	-	Fruto Folha	SPÍNOLA et al., 2019
Ácido ferúlico- <i>O</i> -hexosídeo	Ácido hidroxicinâmico	-	Fruto	ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ et al., 2015
Derivado de ácido ferúlico	Ácido hidroxicinâmico	-	Folha	SPÍNOLA et al., 2019
Derivado de ácido cafeico- <i>O</i> -hexosídeo	Ácido hidroxicinâmico	-	Folha	SPÍNOLA et al., 2019
Derivado do ácido cafeico	Ácido hidroxicinâmico	-	Folha	SPÍNOLA et al., 2019
Ácido cafeico- <i>O</i> -(galoil) hexosídeo	Ácido hidroxicinâmico	-	Folha	SPÍNOLA et al., 2019
Umbeliferona	Ácido hidroxicinâmico	93-35-6	Folha	GOUVEIA-FIGUEIRA; CASTILHO, 2015
Ácido cafeico- <i>O</i> -dihexosídeo	Ácido hidroxicinâmico	-	Folha	OSZMIANSKI et al., 2015
Ácido cafeico- <i>O</i> -(cumaroil) hexosídeo	Ácido hidroxicinâmico	-	Folha	SPÍNOLA et al., 2019
Ácido cumárico	Ácido hidroxicinâmico	501-98-4	Folha	SPÍNOLA et al., 2019 PUBCHEM, 2019
Quercetina- <i>O</i> -(pentosil) hexosídeo	Flavonol	-	Fruto	JAIWAL; JAYASINGHE; KUHNERT, 2012 BUJOR et al., 2016
Isoramnetina- <i>O</i> -glicuronídeo	Flavonol	-	Fruto	MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2012 WON et al., 2018
Rutina	Flavonol	153-18-4	Fruto Folha	BRESCIANI et al., 2015 PUBCHEM, 2019
Quercetina- <i>O</i> -hexosídeo	Flavonol	482-35-9	Fruto Folha	BUJOR et al., 2016 PUBCHEM, 2019
Quercetina- <i>O</i> -glicuronídeo	Flavonol	22688-79-5	Fruto Folha	MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2012 PUBCHEM, 2019

Tabela 5 (Continuação) - Dados dos principais polifenóis identificados em extratos metanólicos de *Rubus grandifolius* descritos na literatura

3-Hidroxi-3-metilglutaroil-quercetina- <i>O</i> -hexosídeo	Flavonol	-	Fruto	GOUVEIA-FIGUEIRA; CASTILHO, 2015
Quercetina- <i>O</i> -pentosídeo	Flavonol	22255-13-6	Fruto Folha	JAISWAL; JAYASINGHE; KUHNERT, 2012 BRESCIANI et al., 2015
Quercetina- <i>O</i> -(acetil) hexosídeo	Flavonol	54542-51-7	Fruto Folha	MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2012 PUBCHEM, 2019
Canferol- <i>O</i> -hexosídeo	Flavonol	-	Folha	MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2012 PUBCHEM, 2019
Derivado de isoramnetina	Flavonol	-	Fruto	SPÍNOLA et al., 2019
Canferol- <i>O</i> -(cumaroil) hexosídeo	Flavonol	17650-84-9	Fruto Folha	MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2012 PUBCHEM, 2019
Quercetina	Flavonol	117-39-5	Fruto	SPÍNOLA et al., 2019 PUBCHEM, 2019
Dímero de proantocianidina (tipo B)	Flavan-3-ol	-	Folha	BUJOR et al., 2016
Catequina	Flavan-3-ol	7295-85-4	Folha	SPÍNOLA et al., 2019 PUBCHEM, 2019
Apigenina- <i>O</i> -glicuronídeo	Flavona	-	Folha	OSZMIAŃSKI et al., 2015
Pedunculagina I	Derivados de ácido elágico / Elagitaninos	-	Fruto Folha	BRESCIANI et al., 2015
Trigaloil- <i>O</i> -hexosídeo	Derivados de ácido elágico / Elagitaninos	-	Folha	GORDON et al., 2011
Ácido elágico- <i>O</i> -glicuronídeo	Derivados de ácido elágico / Elagitaninos	-	Fruto	GOUVEIA-FIGUEIRA; CASTILHO, 2015 KUMAR, SINGH; KUMAR, 2017
Casuarinina	Derivados de ácido elágico / Elagitaninos	79786-01-9	Fruto Folha	OSZMIAŃSKI et al., 2015 PUBCHEM, 2019
Ácido elágico- <i>O</i> -pentosídeo	Derivados de ácido elágico / Elagitaninos	-	Fruto Folha	BRESCIANI et al., 2015
Derivado do ácido elágico	Derivados de ácido elágico / Elagitaninos	-	Folha	SPÍNOLA et al., 2019
Ácido elágico- <i>O</i> -hexosídeo	Derivados de ácido elágico / Elagitaninos	-	Fruto Folha	MENA et al., 2012
Derivado de ácido elágico	Derivados de ácido elágico / Elagitaninos	-	Fruto	SPÍNOLA et al., 2019

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Baseado no estudo de Spínola e colaboradores (2019), e sabendo-se que os compostos fenólicos são os constituintes majoritários de *R. grandifolius*, optamos por efetuar uma breve revisão da literatura sobre essa classe química.

2.3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS: ORIGEM E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os metabólitos secundários são substâncias produzidas pelas plantas, abrangendo uma ampla diversidade de moléculas de origem não proteica. Eles não exercem um papel crucial para o crescimento e desenvolvimento das células dos vegetais; porém, desempenham diversas outras características importantes para as plantas como na defesa, na resposta celular ao estresse ambiental. Nos frutos que possuem valor comercial, estes metabólitos estão intimamente relacionados aos atributos de qualidade do produto (LI et al., 2020).

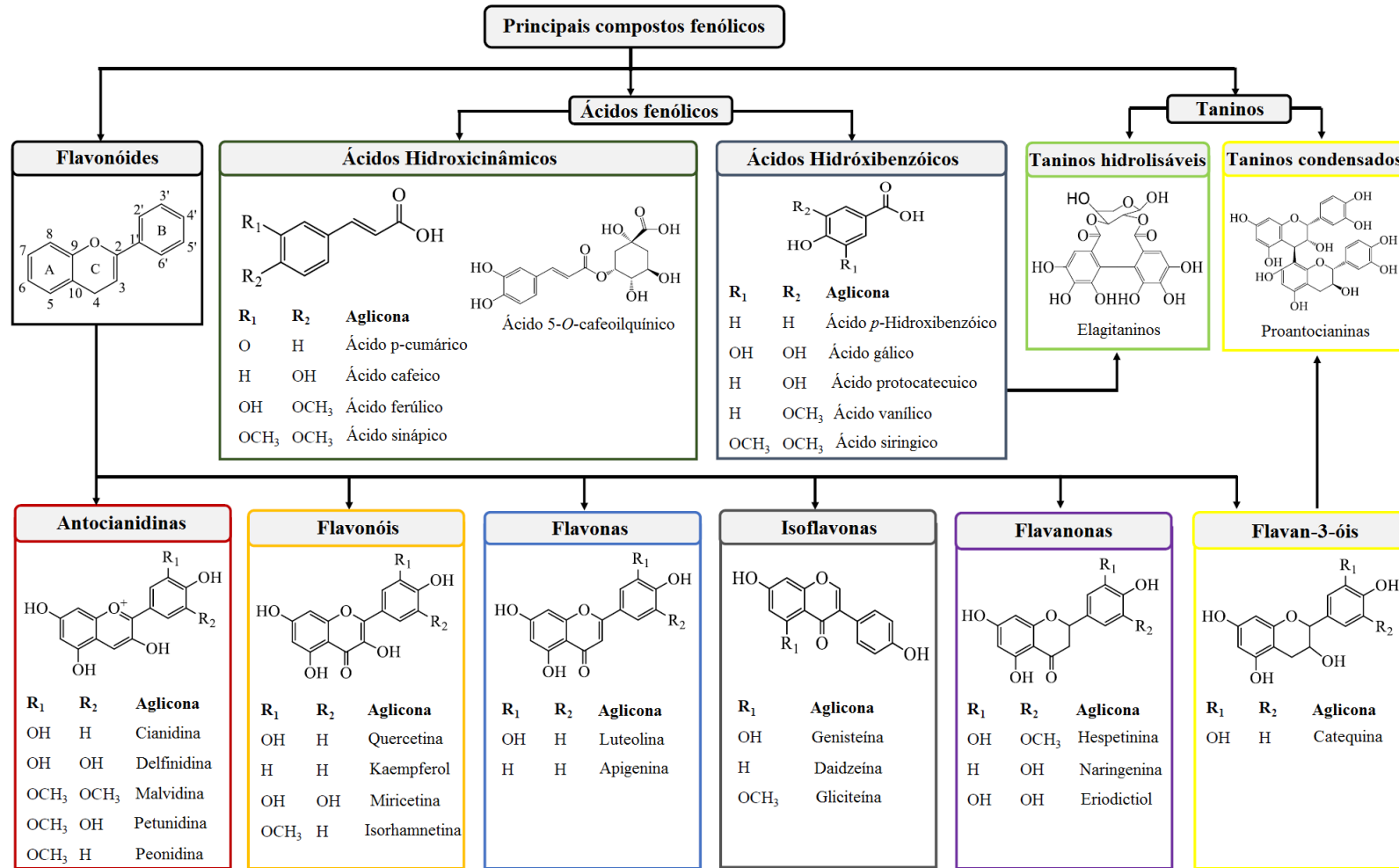
Os metabólitos secundários originam-se do metabolismo da glicose via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Já os derivados do acetato podem ser classificados, segundo a via metabólica seguida, em: derivados do acetato, via ciclo do ácido cítrico; derivados do acetato, via mevalonato e; produtos da condensação do acetato. Alguns metabólitos secundários derivam de ambos intermediários, sendo então resultantes da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou seus derivados, como é o caso das antraquinonas, dos flavonoides e dos taninos condensados (DEWICK, 2009; SIMÕES et al., 2007).

Dentre as diversas classes de compostos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas destacam-se os compostos fenólicos, que constituem uma ampla e diversificada classe de metabólitos secundários, de baixo a alto peso molecular, resultantes das vias do ácido chiquímico, acetato e mevalonato (SPÍNOLA, 2018) mencionadas anteriormente.

Os compostos fenólicos constituem o principal grupo de constituintes fitoquímicos encontrados nas plantas, exibindo enorme diversidade química e variadas funções (TOHMA et al., 2016; SUN et al., 2020). Estas substâncias estão intimamente relacionadas a diversos efeitos benéficos à saúde relacionados as suas atividades biológicas, entre elas antibacteriana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, anti-aterosclerótica, antiproliferativa, entre outras (DIAS et al., 2016; HIDALGO; ALMAJANO, 2017; SPÍNOLA, 2018; TOHMA et al., 2016). Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grupos principais de acordo com sua estrutura química: não flavonoides e flavonoides. No grupo dos não flavonoides destacam-se os ácidos fenólicos, que são subdivididos em duas classes: ácidos hidroxibenzoico (AHB) e hidroxicinâmico

(AHC); e os taninos, também subdivididos em duas classes: taninos hidrolisáveis e condensados. Os flavonoides representam um grupo de moléculas mais complexas que os citados anteriormente e são divididos em seis subgrupos principais: flavonois, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavan-3-óis e antocianidinas (SPÍNOLA, 2018) (Figura 9).

Figura 9 - Estrutura química básica dos principais compostos fenólicos.



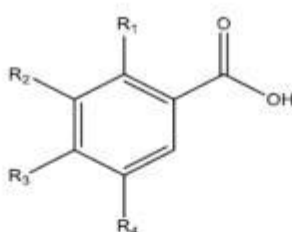
Fonte: Adaptado de Spínola (2018).

Considerando a variedade de compostos produzidos pelas plantas e sua íntima relação com as atividades biológicas, a seguir, apresentaremos uma breve revisão sobre os ácidos fenólicos (não flavonoides) e flavonoides, principais compostos fenólicos presentes em *R. grandifolius*, espécie vegetal objeto do presente estudo.

2.3.3.1 Não Flavonoides

Os ácidos fenólicos são substâncias que possuem apenas um anel fenólico e são classificados como AHBs e AHCs. Os AHBs possuem uma estrutura comum de C₆-C₁ e são derivados do ácido benzoico (Figura 10). Podem ser encontrados na forma solúvel (conjugados com açúcares ou ácidos orgânicos) e ligados às frações da parede celular como lignina (KUMAR; GOEL, 2019). Uma variedade de AHBs podem ser formados dependendo das substituições que ocorrerem nos radicais, como por exemplo os ácidos *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, gálico, vanílico e siríngico (Figura 10) (BAHADORAN; MIRMIRAN; AZIZI, 2013; KUMAR; GOEL, 2019; MARTINS et al., 2011).

Figura 10 - Estrutura básica do ácido benzoico e suas respectivas substituições que originam diferentes ácidos hidroxibenzoico

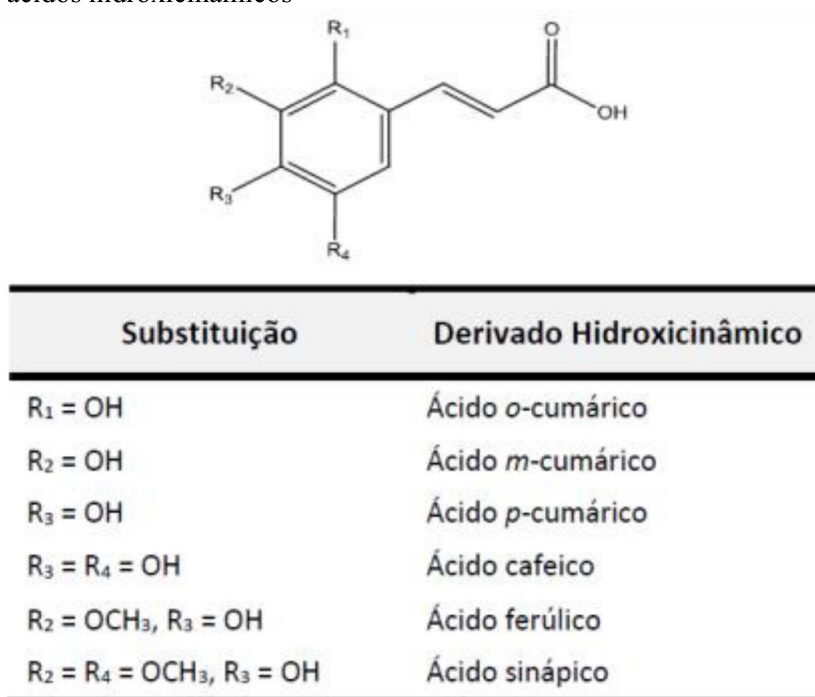


Substituição	Derivado Hidroxibenzoico
R ₃ = OH	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico
R ₃ = R ₄ = OH	Ácido protocatecuico
R ₂ = OCH ₃ , R ₃ = OH	Ácido vanílico
R ₂ = R ₃ = OCH ₃	Ácido verátrico
R ₂ = R ₃ = R ₄ = OH	Ácido gálico
R ₁ = R ₄ = OH	Ácido gentisico
R ₂ = R ₄ = OCH ₃ , R ₃ = OH	Ácido siríngico
R ₁ = OH, R ₄ = HSO ₃	Ácido 5-sulfosalicílico

Fonte: Pinto (2016).

Os AHCs mais comuns são os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, sinápico e cafeico (Figura 11), no qual, esse último, frequentemente se apresenta esterificado com o ácido quínico, como nos ácidos cafeoilquinoicos. Os AHCs estão geralmente presentes em frutas, maçãs, cereais, café e vegetais de folhas verdes (BAHADORAN; MIRMIRAN; AZIZI, 2013; SPÍNOLA, 2018).

Figura 11 - Estrutura básica do ácido cinâmico e suas respectivas substituições que originam diferentes ácidos hidroxicinâmicos



Fonte: Pinto (2016).

2.3.3.2 Flavonoides

Os flavonoides representam uma classe de polifenóis amplamente distribuída na natureza. São encontrados em frutas, vegetais, nozes, cacau, chás, sementes de grãos e ervas consumidas diariamente (AL-ISHAQ et al., 2019; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016), representando uma grande classe de metabólitos secundários com cerca de 8000 substâncias já identificadas (AL-ISHAQ et al., 2019). Nas plantas, estes metabólitos são conhecidos como produtores de pigmentos, responsáveis pelo odor e cor das flores, frutos e folhas, modulam os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), estão envolvidos em mecanismos de defesa contra a radiação ultravioleta e ataque de herbívoros (AL-ISHAQ et al., 2019; BUER; IMIN; DJORDJEVIC, 2010), além de serem sintetizados pelas plantas em resposta às infecções microbianas (KUMAR; PANDEY, 2013).

Possuem em sua estrutura básica dois anéis fenólicos (anéis A e B) ligados por uma cadeia de três carbonos que constitui um heterociclo oxigenado (anel C), formando, portanto, uma configuração C₆-C₃-C₆ (Figura 9) (AL-ISHAQ et al., 2019; MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019). Com base nos padrões de substituição do anel C (oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação, outros), os flavonoides podem ser divididos em seis subclasses principais, a saber: flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavan-3-óis e antocianidinas (MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019; SPÍNOLA, 2018).

Nas plantas, frequentemente os flavonoides se apresentam conjugados com moléculas de açúcar formando *O*-heterosídeos (açúcares ligados ao grupo hidroxila) ou *C*-heterosídeos (açúcares ligados ao carbono). Esta conjugação produz carboidratos como L-ramnose, D-glicose, glicoramnose, galactose ou arabinose (KUMAR; PANDEY, 2013).

O grande interesse neste diversificado grupo de metabólitos secundários se dá, entre outras razões, pelas inúmeras atividades farmacológicas que conferem benefícios à saúde humana relacionadas aos compostos desta classe, entre elas merecem destaque as propriedades antibacteriana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, hepatoprotetora, antimutagênica e anticancerígena, além de serem utilizadas para o tratamento de doenças cardiovasculares (AL-ISHAQ et al., 2019; KUMAR; PANDEY, 2013; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

Tendo em vista o rico conteúdo fenólico da espécie *R. grandifolius* e o uso popular para diversos fins medicinais, o presente estudo faz-se importante para investigar seu uso tradicional como antibiótico.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral a triagem de extratos metanólicos procedentes da Ilha da Madeira e Açores, Portugal, e posterior análise da composição química e investigação da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos metanólicos obtidos de folhas e frutos de *R. grandifolius*, visando fornecer subsídio científico para seu uso tradicional como antibiótico.

3.2 ESPECÍFICOS

Tendo como base o objetivo geral citado acima, este estudo teve como objetivos específicos:

3.2.1 Efetuar a triagem *in vitro* da atividade antibacteriana de vinte extratos metanólicos, sendo doze obtidos de folhas, seis de frutos e dois de flores de plantas procedentes da Ilha da Madeira e Açores, Portugal, previamente caracterizados quimicamente pela Profa. Dra. Paula Cristina Machado Ferreira Castilho, visando selecionar as espécies vegetais que demonstrassem propriedades mais promissoras;

3.2.2 Investigar a atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos metanólicos das espécies vegetais previamente selecionadas frente cepas clinicamente relevantes; e

3.2.3. Analisar e discutir, com mais profundidade, os resultados obtidos com *R. grandifolius*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

Um total de vinte extratos metanólicos, sendo doze de folhas, seis de frutos e dois de flores, obtidos de treze diferentes espécies vegetais procedentes da Ilha da Madeira e Açores, Portugal, e gentilmente cedidos e quimicamente caracterizados pela Profa. Dra. Paula Cristina Machado Ferreira Castilho (Tabela 6), foram submetidos a uma triagem *in vitro* quanto ao seu potencial antibacteriano para seleção daquele (s) mais ativo (s) e promissor (es) para dar prosseguimento ao presente estudo. Após a análise dos resultados oriundos desta etapa, foram selecionados os extratos metanólicos dos frutos e folhas de *R. grandifolius* para aprofundamento desta investigação. Todos os procedimentos que serão apresentados a seguir foram realizados, portanto, para esta espécie vegetal.

Tabela 6 - Lista dos vinte extratos metanólicos obtidos de diferentes espécies vegetais da Ilha da Madeira e Açores, Portugal

Extrato Metanólico		Parte da Planta
Família	Gênero / Espécie	
Compositae	<i>Artemisia argentea</i>	Folha
Compositae	<i>Helichrysum devium</i>	Folha
Compositae	<i>Helichrysum melaleucum</i>	Folha
Compositae	<i>Helichrysum melaleucum</i>	Flor
Compositae	<i>Helichrysum obconicum</i>	Folha
Aquifoliaceae	<i>Ilex perado</i>	Folha
Exobasidiaceae	<i>Laurobasidium lauri</i>	Fruto
Myricaceae	<i>Myrica faya</i>	Folha
Myricaceae	<i>Myrica faya</i>	Fruto
Rosaceae	<i>Rubus grandifolius</i>	Folha
Rosaceae	<i>Rubus grandifolius</i>	Fruto
Adoxaceae	<i>Sambucus lanceolata</i>	Fruto
Plantaginaceae	<i>Sibthorpia peregrina</i>	Folha
Leguminosae	<i>Ulex europaeus</i>	Flor
Leguminosae	<i>Ulex europaeus</i>	Folha
Ericaceae	<i>Vaccinium cylindraceum</i>	Folha
Ericaceae	<i>Vaccinium cylindraceum</i>	Fruto
Ericaceae	<i>Vaccinium padifolium</i>	Folha Nova
Ericaceae	<i>Vaccinium padifolium</i>	Folha Madura
Ericaceae	<i>Vaccinium padifolium</i>	Fruto

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

4.1.1 Coleta e processamento do material vegetal

O material vegetal de *R. grandifolius* foi coletado em dois locais diferentes na Ilha da Madeira, no Pico do Arieiro, Funchal (32° 42' 50.72" N, 16° 55' 55.07" O) e em Santo Antônio da Serra, Machico (32° 43' 13.72" N, 16° 51' 2.43" O), em setembro de 2014. A identificação do material vegetal foi realizada pelos Doutores Francisco Carvalho e José Augusto Carvalho do Jardim Botânico da Madeira e depositados no Herbário do Jardim Botânico da Madeira (Funchal, Madeira, Portugal) sob os números de vouchers MADJ08618 e MADJ05179, respectivamente.

Os procedimentos descritos nos itens 4.1.1 a 4.3.2 foram realizados pelo Dr. Vítor Agostinho Rodrigues Spínola, no Centro de Química da Universidade da Madeira, Funchal, Portugal, sob supervisão da Profa. Dra. Paula Cristina Machado Ferreira Castilho. Todos os dados presentes nessas sessões já foram publicados (SPÍNOLA, 2018; SPÍNOLA et al., 2019) e serão reescritos aqui com o consentimento dos autores. As folhas foram submetidas à secagem no escuro e em temperatura ambiente (~ 25 °C) por uma semana. A secagem é uma operação extremamente importante que ocorre normalmente no preparo pré-analítico da espécie vegetal visando remover a umidade dos tecidos vegetais, diminuindo assim o peso e preservando ou diminuindo a probabilidade de deterioração do material vegetal, que pode ocorrer devido à presença de umidade (SEJALI; ANUAR, 2011). Após a secagem, as folhas foram moídas e transformadas em um pó fino em moinho mecânico (tamanho de 60 mesh). Os frutos maduros foram lavados e congelados à -80 °C. Posteriormente, foram secos em liofilizador (Alpha 1-2 LD *plus freeze dryer*) (CHRIST, An der Unteren Söse 50, 37520, Osterode am Harz, Alemanha). Em seguida, o material seco foi triturado em pó usando um moinho mecânico (tamanho de 60 mesh) e armazenado à temperatura de -20 °C em sacos plásticos selados até a realização do procedimento de extração.

4.2 PROCESSO DE EXTRAÇÃO

Após o procedimento realizado no item 4.1, a extração de compostos fenólicos seguiu o seguinte protocolo: para cada 1 g de material vegetal liofilizado foram utilizados 25 mL de metanol (para as folhas) e 25 mL de solução de extração composta por MeOH/H₂O (acidulado com ácido acético 7%) (80:20, v/v) (para os frutos) em Erlenmeyer de 100 mL envolto em papel alumínio seguido por um banho ultrassônico (Bandelin Sonorex, Alemanha) em 35 kHz e 200 W por 60 min à temperatura ambiente (22 ± 2 °C). Após sonicação, as soluções foram filtradas

através de filtros de papel Whatman No.1, concentradas até a secura sob pressão reduzida em um evaporador rotativo (Buchi Rotavapor R-114; EUA) a 40 °C (sob luz reduzida). Extrações em duplicata foram feitas para cada amostra e os extratos secos resultantes (ES) foram armazenados em frascos com tampa de 5 mL a 4 °C até posterior análise. No caso das folhas, foi utilizado um passo extra para remoção de clorofilas. Após o primeiro passo de filtração, uma pequena quantidade de carvão ativado foi adicionada ao extrato líquido e, após mistura durante alguns segundos, a solução foi filtrada. Em seguida, concentrou-se até secura e esses foram armazenados conforme mencionado anteriormente. Dessa forma, obteve-se, então, os extratos metanólicos das folhas e frutos de *R. grandifolius*.

4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS METANÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY* (CLAE-DAD-ESI/EMⁿ)

4.3.1 Preparação da amostra

Foram preparadas soluções de extrato na concentração de 5 mg/mL pela dissolução de cada ES na fase móvel inicial utilizada na CLAE [H₂O ultrapura (UP):acetonitrila (ACN); 80:20; v/v]. Essas soluções foram filtradas através de membranas de microporos de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,45 µM antes do uso. Cinco microlitros foram injetados para análise por CLAE-DAD-ESI/EMⁿ.

4.3.2 Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com ionização por *Electrospray* (CLAE-DAD-ESI/EMⁿ)

A análise por CLAE-DAD-ESI/EMⁿ foi realizada segundo parâmetros descritos previamente por Gouveia-Filgueira e Castilho (2015) em equipamento Dionex ultimate 3000 series (Thermo Scientific Inc., Califórnia, EUA) composto por uma bomba binária, um amostrador automático, um compartimento de coluna, um detector de arranjo de diodos hifenizado a um detector de massas de armadilha de íons (Bruker Esquire modelo 6000; Bremen, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI). A separação dos compostos fenólicos (CF) foi realizada usando as condições cromatográficas resumidas na Tabela 7. Cada solução de extrato foi injetada e analisada em triplicata.

Tabela 7 - Condições do procedimento da análise dos extratos metanólicos das folhas e frutos de *Rubus grandifolius* por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (CLAE-DAD-ESI/EMⁿ)

Condições de análise da CLAE	
Coluna	Coluna Phenomenex Gemini C18 (5 µm, 250 x 3,0 mm i.d.)
Fluxo da fase móvel	0,4 mL / min
Volume de injeção	5 µL
Temperatura da coluna	30 °C
Fase móvel	A: Água ultrapura acidificada (com ácido fórmico a 0,1%, v / v) B: Acetonitrila
Gradiente de eluição	20% B (0 min), 25% B (10 min), 25% A (20 min), 50% B (40 min), 100% B (42 - 47 min), 20% B (49 - 55 min)
Detecção	DAD (210 - 520 nm) EM ⁿ (ESI ⁻ , ESI ⁺)

Fonte: Adaptado de Gouveia-Filgueira e Castilho (2015).

Para a análise por espectrometria de massa foi utilizado um instrumento Bruker Esquire (Bremen, Alemanha) modelo 6000 com detector do tipo armadilha de íons, equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI). A análise foi realizada nos modos negativo e positivo, onde o intervalo de varredura foi definido em m/z 100-1000 com uma velocidade de 13.000 Da/s. As condições de ESI foram: O nitrogênio (N₂) de alta pureza foi usado como gás de secagem, com um fluxo de 10 mL/min e também como gás nebulizador a uma pressão de 50 psi; a temperatura do nebulizador foi ajustada para 365 °C; tensão capilar a 4500 eV; pressão e energia do gás de colisão (He) ultrapuro, 1×10^{-5} mbar e 40 eV. A aquisição dos dados foi feita no modo MSⁿ automático, com largura de isolamento de 4,0 m/z e amplitude de fragmentação de 1,0 V (MSⁿ até MS⁴). Os *softwares Esquire Control e Data Analysis* (Bremen, Alemanha) foram utilizados para aquisição e processamento de dados, respectivamente.

4.4 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro* DOS EXTRATOS DE PLANTAS PROCEDENTES DA ILHA DA MADEIRA E AÇORES

A atividade antibacteriana *in vitro* dos vinte extratos metanólicos listados na Tabela 6 (pág. 55) foi investigada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) empregando o método de microdiluição em caldo seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) descritas no documento M07-A10 (CLSI, 2015).

Posteriormente, foi estabelecida a concentração bactericida mínima (CBM) seguida da classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático segundo o método descrito por Andrews (2001), com pequeno ajuste do meio de cultura utilizado [IsoSensitest Agar (ISA; Oxoid, Basingstoke, UK) foi substituído por Ágar Müeller Hinton (AMH; Difco[®] Laboratories, Spark, MD, USA)].

Todos os ensaios bacteriológicos foram realizados no Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular, Centro de Pesquisas Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Silvana Alves, utilizando os seguintes equipamentos: cabine de Segurança biológica classe II B2 (Veco[®], Campinas, SP, Brasil); estufa bacteriológica (Quimis[®], Diadema, SP, Brasil); autoclave (Primatec[®], Itu, SP, Brasil), micropipetas individuais de várias capacidades e multicanal com 12 saídas (Thermo Scientific[®], Waltham, MA, EUA), estufa de secagem e esterilização (Limatec, RJ, Brasil), forno de micro-ondas (LG Eletronic[®] Brasil, SP, Brasil), equipamento de osmose reversa (Permutation[®], PR, Brasil), pHmetro digital (Hanna[®] Instruments Brasil, SP, Brasil), banho de água com termostato (Biothec, SP, Brasil), refrigeradores (Electrolux[®] Brasil, SP, Brasil), agitador tipo vórtex (Arsec, SP, Brasil) e balança analítica (Edutec, PR, Brasil).

Para a realização dos ensaios microbiológicos de triagem dos vinte extratos metanólicos, foram empregadas cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC[®]), na segunda passagem, obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil, e também adquiridas comercialmente da empresa PlastLabor[®], Rio de Janeiro, Brasil, representativas de grupos bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos fermentadores e não fermentadores, perfazendo um total de nove cepas: i) Gram-positivos: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 6538); ii) Gram-negativos fermentadores: *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC 10536), *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC 25922), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar Choleraesuis (ATCC 10708) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar Typhimurium (ATCC 13331); e iii) Gram-negativos não fermentadores: *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (ATCC 9027) e *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (ATCC 27853), descritas conforme solicitado pela ATCC[®].

Após a seleção de cinco extratos metanólicos que se mostraram mais promissores para uma segunda avaliação, foram acrescentadas quatro cepas clínicas para análise do extrato mais efetivo: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) 1485279 (Figura 12), *Escherichia coli* 2856403 produtora de β -lactamase de espectro ampliado e resistente à ciprofloxacina, norfloxacina e ácido nalidíxico (Figura 13), *Salmonella* spp. 1507708 resistente à ciprofloxacina, levofloxacina e ácido nalidíxico (Figura 14) e *Pseudomonas aeruginosa* 2854386 resistente à cefoxitina, ceftriaxona e tigeciclina (Figura 15). Essas quatro cepas foram isoladas de espécimes clínicos obtidos de pacientes atendidos no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, identificadas pelo sistema automatizado VITEK[®]2 (BioMérieux, Durham, NC, EUA) e gentilmente cedidas pela Dra. Adriana Lúcia Pires Ferreira, responsável pelo Laboratório de Bacteriologia do Serviço de Patologia Clínica dessa Instituição.

Figura 12 - Imagem ilustrativa dos dados de sensibilidade da cepa *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) 1485279 isolada de hemocultura (sangue) e identificada e testada pelo sistema VITEK®2

Hospital Universitario Clementino Fraga Filho - UFRJ
 Serviço de Patologia clinica
 Laboratorio de Bacteriologia

Patient Report (Default)

Nome, Sobrenome: ██████████
 Prontuario ██████████
 Prontuario Alt: ██████████
 ...:

Nome de nascimento: ██████████
 Sexo: Feminino
 Serviço: Emergê
 Localização/Enf: 7B

Especime Clínico: Sangue
 Sítio da coleta: Periférico
 Data da coleta: 18/03/2011 05:34 PM
 Comentários da amostra: MPZ(cateter) MNF(periferico)

Numero de amostras: 2
 N. de Amostras Positivas: 2
 Data de recebimento: 18/03/2011 05:34 PM

Reg. do Laboratorio: 1485279
 Comentários:

Tipo de Exame: Hemocultura
 Resultado da cultura: Positive

Numero do Isolado: 1
 Staphylococcus aureus <staur>

	1 staur	
	MIC	Cat.
Benzilpenicilina	>=0.5	R
Cilindamicina Macrolideo	>=8	R
Eritromicina Macrolideo	>=8	R
Gentamicina Aminoglicosideo	<=0.5	S
Linezolid	2	S
Moxifloxacina	1	I
Oxacilina	>=4	R
Resistência induzida a clindamicina	Neg	-
Rifampicina	2	I
Teicoplanina	<=0.5	S
Teste de screening de cefoxitina	Pos	+
Tigeciclina	<=0.12	S
Trimetoprim/Sulfametoxazol	<=10	S
Vancomicina	2.0	S
Ácido Fusídico	<=0.5	S

*Deduced

Teste de sensibilidade à metilina → MRSA

R

Page 1 of 1 13/02/2017 09:47 AM

Figura 13 - Imagem ilustrativa dos dados de sensibilidade da cepa *Escherichia coli* 2856403 produtora de β -lactamase de espectro ampliado e resistente à ciprofloxacina, norfloxacina e ácido nalidíxico isolada de urina e identificada e testada pelo sistema VITEK®2

Hospital Universitario Clementino Fraga Filho - UFRJ
 Serviço de Patologia clínica
 Laboratório de Bacteriologia

Patient Report (Default)

Nome, Sobrenome: ██████████
 Prontuario: ██████████
 Prontuario Alt: ██████████

Data de nascimento: 22/05/1949
 Sexo: F
 Serviço:
 Localização/Enf: AMBULATO

Especime Clínico: Urina
 Sítio da coleta:
 Data da coleta: 27/08/2019 01:17 PM
 Reg. do Laboratório: 2856403
 Comentários:

Numero de amostras:
 Teste Fenotípico:
 Data de recebimento: 28/08/2019 01:15 PM
 Tipo de Exame: CULT

Numero do Isolado: 1
 (> 100.000 UFC/ml) *Escherichia coli* <esccol>

	1 esccol	
	MIC	Cat.
Amicacina	<=2	S
Amoxicilina/Ácido clavulânico	4	S
Ampicilina	>=32	R
BLSE	Pos	+
Cefalotina	>=64	R
Cefepima	<=1	S
Ceftriaxona	>=64	R
Cefuroxima Axetil	>=64	R
Ciprofloxacina	>=4	R ✓
Ertapenem	<=0,5	S
Gentamicina	>=16	R
Meropenem	<=0,25	S
Nitrofurantoína	<=16	S
Norfloxacina	>=16	R ✓
Piperacilina/Tazobactam	<=4	S
Trimetoprim/Sulfametoxazol	>=320	R
Ácido Nalidíxico	>=32	R

*= Deduced

Page 1 of 1

30/08/2019 09:46 AM

Figura 14 - Imagem ilustrativa dos dados de sensibilidade da cepa *Salmonella* spp. 1507708 resistente à ciprofloxacina, levofloxacina e ácido nalidíxico isolada de hemocultura (sangue) e identificada e testada pelo sistema VITEK®2

Hospital Universitario Clementino Fraga Filho - UFRJ
 Serviço de Patologia clinica
 Laboratorio de Bacteriologia

Patient Report (Default)

Nome, Sobrenome: ██████████
 Prontuario ██████████
 Prontuario Alt: ██████████

Nome de nascimento: ██████████
 Sexo: Masculino
 Serviço: Emergência
 Localização/Enf: ██████████

Especime Clinico: Sangue
 Sitio da coleta: periferico
 Data da coleta: 13/05/2011 02:55 PM

Numero de amostras: 2
 N. de Amostras Positivas: 2
 Data de recebimento: 13/05/2011 02:55 PM

Reg. do Laboratorio: 1507708
 Comentarios:

Tipo de Exame: Hemocultura
 Resultado da cultura: Positive

Numero do Isolado: 1
 Salmonella group <salgrp>

	1 salgrp	
	MIC	Cat.
Amicacina	<=2	R
Amoxicilina/Ácido clavulânico	8	S
Ampicilina	>=32	R
Cefepima	<=1	S
Cefotaxima	<=1	S
Cefoxitina	<=4	R
Ceftazidima	<=1	S
Ciprofloxacina	>=4	R
Ertapenem	<=0.5	S
Gentamicina	>=16	R
Levofloxacina	>=8	R
Meropenem	<=0.25	S
Nitrofurantoína	<=16	S
Piperacilina/Tazobactam	16	S
Trimetoprim/Sulfametoxazol	>=320	R
Ácido Nalidíxico	>=32	R

*Deduced

Figura 15 - Imagem ilustrativa dos dados da cepa *Pseudomonas aeruginosa* 2854386 resistente à cefoxitina, ceftriaxona e tigeciclina isolada de hemocultura (sangue) e identificada e testada pelo sistema VITEK2®

Laboratório de Bacteriologia - HUCFF
Relatório de Microbiologia

Cliente bioMérieux: 123 Impresso 30/Ago/2019 10:12 CDT

Nome do Doente: [REDACTED] ID do Doente: [REDACTED]
 Local: HM-8F 11 Nº de Isolamento: 1
 ID do Laboratório: [REDACTED]

Quantificação de microrganismos:
Microrganismo Seleccionado: Pseudomonas aeruginosa

Colhido a: 25/Ago/2019 1735

Comentários:

Informações da Identificação	Hora da Análise: 4,85 Horas	Estado: Final
Microrganismo Seleccionado	97% Probabilidade	Pseudomonas aeruginosa
Mensagens de Análise da ID	Bionúmero:	0043453203500050

Informações de Sensibilidade		Hora da Análise: 12,90 Horas		Estado: Final	
Antibiótico	CMI	Interpretação	Antibiótico	CMI	Interpretação
BLSE			Cefepima	4	S
Ampicilina			Ertapenem		
Ampicilina/sulbactam			Imipenem	2	S
Piperacilina/Tazobactam	32	I	Meropenem	<= 0,25	S
Cefuroxima			Amicacina	4	S
Cefuroxima Axetil			Gentamicina	<= 1	S
Cefoxitina	>= 64	R	Ciprofloxacina	1	S
Ceftazidima	4	S	Tigeciclina	>= 8	R
Ceftriaxona	>= 64	R	Colistina	<= 0,5	S

+= Antibiótico Deduzido * = Modificação do AES ** = Modificado pelo Utilizador

Resultados AES	
Confiança:	Consistente

Página 1 de 1

De acordo com os documentos M07-A10 e M100-S30 (CLSI, 2015, 2020), cepas bacterianas devem ser empregadas como controle e garantia da qualidade e validação do método. No presente estudo, foram testadas *S. aureus* (ATCC 29213), *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853). A Tabela 8 apresenta os intervalos dos valores de CIM estabelecidos pelo CLSI (2020) para as cepas citadas frente aos antibióticos ampicilina sódica (AMP) e cloranfenicol (CHL).

Tabela 8 - Intervalo dos valores de Concentração Inibitória Mínima para o controle de qualidade do Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) de organismos não fastidiosos segundo o documento M100-S30 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*

Antibiótico	Concentração Inibitória Mínima (CIM) (µg/mL)		
	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)
AMP	0,5 - 2,0	2,0 - 8,0	Não reportado
CHL	2,0 - 16	2,0 - 8,0	Não reportado

AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol
Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

As cepas ATCC[®] e clínicas foram mantidas como suspensões em solução contendo leite desnatado a 10% (p/v) acrescido de glicerol a 10% (v/v) (solução LDG). Para cada cepa foi preparada uma suspensão densa (obtida a partir de crescimento de 24 horas) diretamente em 1 mL de solução LDG previamente distribuída em tubos plásticos com tampa de rosca próprios para congelamento (Inlab, SP, Brasil). A seguir, estes tubos foram armazenados em uma temperatura de cerca de -20 °C até a realização dos ensaios biológicos.

4.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da CIM das amostras testadas foi empregado o método de microdiluição em caldo conforme descrito no documento M07-A10 (CLSI, 2015). Foram preparadas soluções-estoque (SE) dos vinte extratos metanólicos e de três antibióticos. Foram utilizados diferentes sistemas solvente/diluyente, obtendo-se concentrações finais de 10 mg/mL para as amostras vegetais e 1 mg/mL para os antibióticos AMP (Ampicilina anidra cristalina - Sigma-Aldrich[®] Co., St. Louis, USA), CHL (Cloranfenicol cristalino - Sigma-Aldrich[®] Co., St. Louis, USA) e LEVO (Levofloxacina cristalina - InLab[®], SP, Brasil), conforme apresentado nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

Os extratos metanólicos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, Diadema, SP, Brasil), respeitando o limite máximo de 1% desse diluente em cada poço da placa de microtitulação, conforme recomendação descrita no documento M100-S30 (CLSI, 2020). Com o intuito de otimizar a solubilidade foi utilizado o Tween 80 (surfactante) como solvente. Como diluente foram utilizados etanol 99,5% (EtOH) e água destilada estéril (H₂O_d). Os controles dos testes mostraram que os solventes, nas concentrações utilizadas, não inviabilizaram o crescimento bacteriano, demonstrando, portanto, que não interferiram na atividade antibacteriana *in vitro*. Após o preparo, as SE das amostras vegetais foram submetidas a banho ultrassônico (Limp Sonic, SP, Brasil), sem aquecimento, por dez min.

Tabela 9 - Descrição dos sistemas solvente/diluente utilizados no preparo das soluções estoque dos vinte extratos metanólicos das diferentes partes de plantas procedentes da Ilha da Madeira e Açores, Portugal, para realização do método de microdiluição em caldo

Massa de extrato (mg)	Solvente	Diluente	Concentração Final (mg/mL)
10	20 µL DMSO + 20 µL Tween 80	100 µL EtOH 99,5% + 860 µL H ₂ O _d	10

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

As SEs e de uso dos antibióticos AMP, CHL e LEVO foram preparadas utilizando os solventes/diluentes descritos no documento M100-S30 (CLSI, 2020).

Tabela 10 - Descrição dos sistemas solvente/diluente utilizados no preparo das soluções-estoque e de uso dos antibióticos para realização do teste de microdiluição em caldo

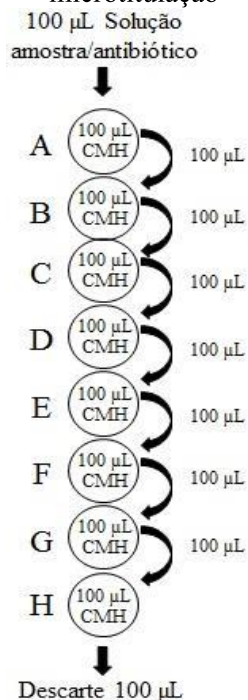
Solução	Antibiótico		
	AMP	CHL	LEVO
	AMP1 (10 mg/mL)	CHL1 (10 mg/mL)	LEVO1 (10 mg/mL)
SE	10 mg Ampicilina anidra cristalina + 1000 µL tampão pH 8,0	10 mg Cloranfenicol cristalino + 500 µL EtOH 95% + 500 µL H ₂ O _d	10 mg Levofloxacina cristalina + 20 µL NaOH 0,1M + 980 µL H ₂ O _d
	AMP2 (1 mg/mL)	CHL2 (1 mg/mL)	LEVO2 (1 mg/mL)
SU	100 µL AMP1 + 900 µL tampão pH 6,0	100 µL CHL1 + 900 µL H ₂ O _d	100 µL LEVO1 + 900 µL H ₂ O _d

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

As cepas ATCC[®] e clínicas foram previamente ativadas em caldo BHI (do inglês, *brain heart infusion*) (Acumedia[®], Indaiatuba, SP, Brasil) e incubadas por um período de 18 a 24 horas em estufa bacteriológica a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em aerobiose. Após este tempo, foram repicadas do caldo BHI para AMH (Difco[®] Laboratories, Spark, MD, USA) e, em seguida, incubadas por um período de 18 a 24 horas em estufa bacteriológica a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em aerobiose. A suspensão bacteriana padronizada foi preparada utilizando-se solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%; p/v) a partir de três a cinco colônias macroscopicamente idênticas isoladas no AMH e ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland [$1-2 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL)]. A turbidez do inóculo bacteriano foi quantificada por densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (Bel Spectro S05, BEL[®] Photonics do Brasil, Piracicaba, SP, Brasil) e a leitura foi realizada no comprimento de onda de 625 nm, onde a medida da absorbância da suspensão bacteriana deveria estar no intervalo de 0,08 e 0,13 (CLSI, 2015).

Os ensaios para a determinação da CIM foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato (Inlab, SP, Brasil). A partir das SEs dos extratos metanólicos e SUs dos antibióticos foram realizadas diluições seriadas diretamente nas placas de microtitulação conforme mostrado na Figura 16, resultando em um gradiente de concentração de 5000 a 40 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos metanólicos e de 500 a 4 $\mu\text{g/mL}$ para os antibióticos. Inicialmente, foram adicionados 100 μL de caldo Müeller-Hinton (CMH) (Difco[®] Laboratories, Spark, MD, USA) em todos os poços da placa de microtitulação. Em seguida, um volume de 100 μL das SEs dos extratos metanólicos e das SUs dos antibióticos foram adicionados na fileira "A", sendo os extratos investigados em quadruplicata e os antibióticos em triplicata. Após a homogeneização, foram transferidos 100 μL da fileira A para B e assim sucessivamente até a fileira H. Dos poços da fileira H foram descartados 100 μL e, dessa forma, todos os poços permaneceram com o volume total de 100 μL . Após o término das diluições seriadas dos extratos e antibióticos foram adicionados 10 μL da suspensão bacteriana padronizada. Para os ensaios com as cepas ATCC[®] e para as clinicamente relevantes MRSA 1485279 e *P. aeruginosa* 2854386, foram utilizados AMP e CHL como antibióticos controle; para o ensaio com as cepas clinicamente relevantes *Salmonella* spp. 1507708 e *E. coli* 2856403 foi utilizada, adicionalmente, a levofloxacina (LEVO) como antibiótico controle, conforme preconizado pelo documento M100-S30 (CLSI, 2020).

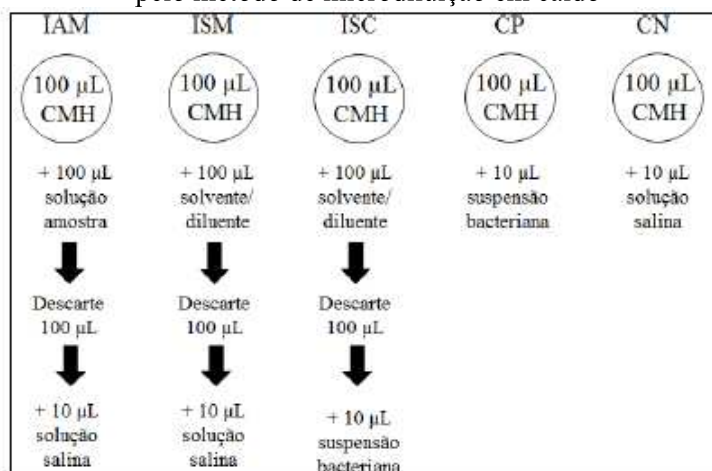
Figura 16 - Esquema representativo do procedimento de diluição seriada realizado em placa de microtitulação



Fonte: Adaptado de Temponi (2012).

Para garantir a qualidade e a reprodutibilidade do ensaio, para cada cepa testada foi preparada uma placa de microtitulação contendo os antibióticos / controles positivos e outra placa contendo os controles negativos a fim de avaliar a interferência das amostras (extratos e antibióticos) sobre o CMH (meio) (IAM), dos sistemas solvente/diluyente sobre o CMH (ISM) e sobre o crescimento bacteriano (ISC), controles positivo (CP) e negativo (CN), conforme esquema ilustrativo da Figura 17.

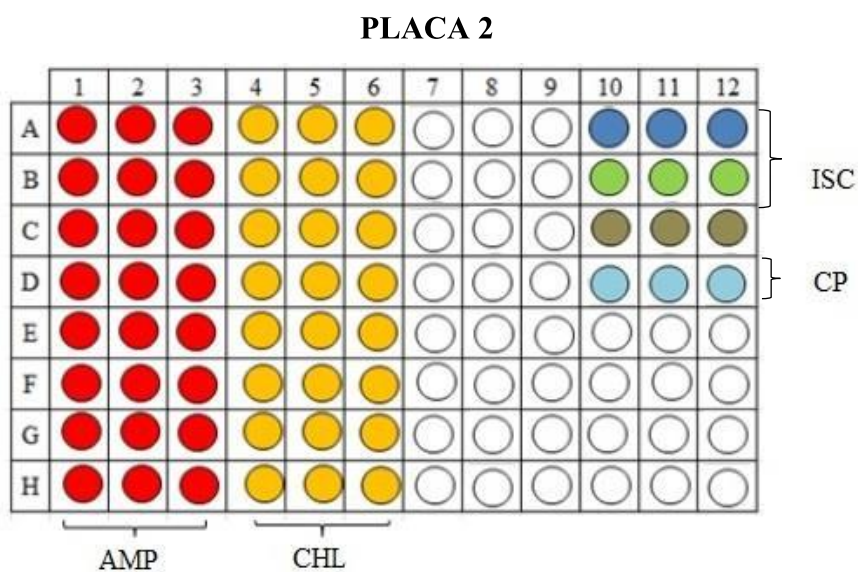
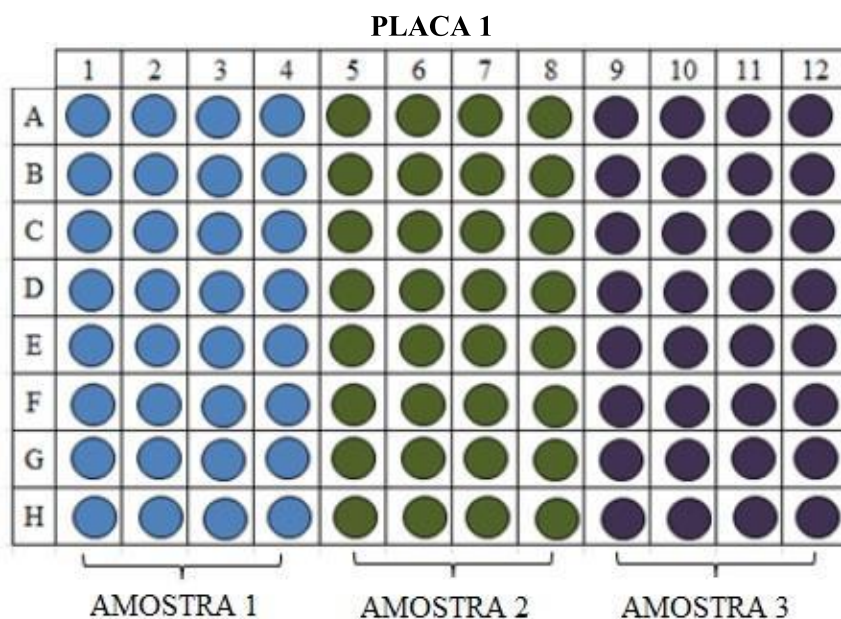
Figura 17 - Esquema ilustrativo dos controles da determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição em caldo



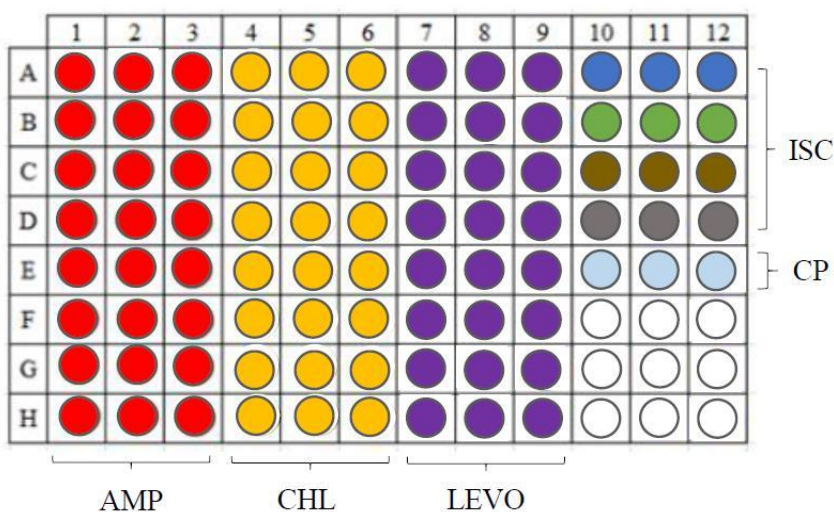
IAM: interferência da amostra sobre o meio; ISM: interferência do solvente/diluyente sobre o meio; ISC: interferência sobre o crescimento bacteriano; CP: controle positivo; e CN: controle negativo.
Fonte: Adaptado de Santana (2015).

Os esquemas ilustrativos das placas de microtitulação utilizados para determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo para cada cepa bacteriana testada foram montados conforme mostrado na Figura 18.

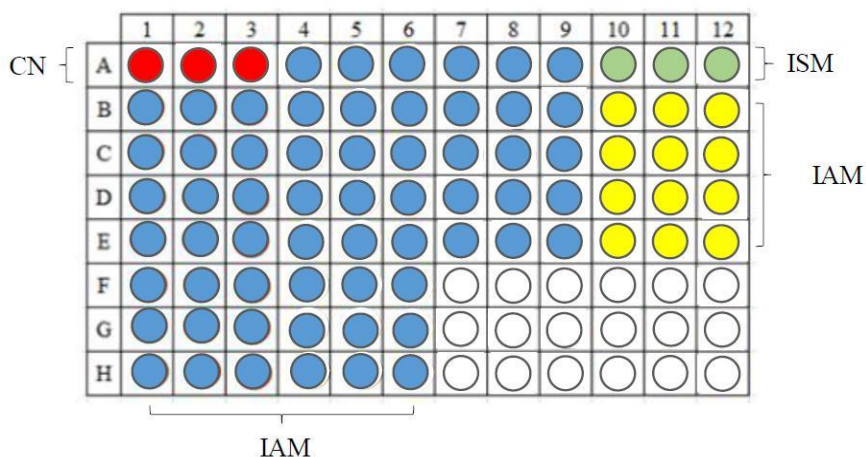
Figura 18 - Esquema ilustrativo da organização das placas de microtitulação para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo dos extratos metanólicos de diferentes partes de plantas procedentes da Ilha da Madeira e Açores, Portugal (Placa 1), dos antibióticos/controles positivos utilizados nos ensaios com as cepas ATCC® e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina 1485279 (Placa 2), dos antibióticos/controles positivos utilizados no ensaio com *Salmonella* spp. 1507708 e *Escherichia coli* 2856403 (Placa 3) e dos controles negativos dos ensaios (Placa 4).



PLACA 3



PLACA 4



AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; LEVO: levofloxacina; ISC: interferência sobre o crescimento bacteriano; ISM: interferência sobre o meio de cultura; IAM: interferência sobre a amostra; CP: controle positivo; e CN: controle negativo. Poços em branco não foram utilizados.

Fonte: Adaptado de Santana (2015).

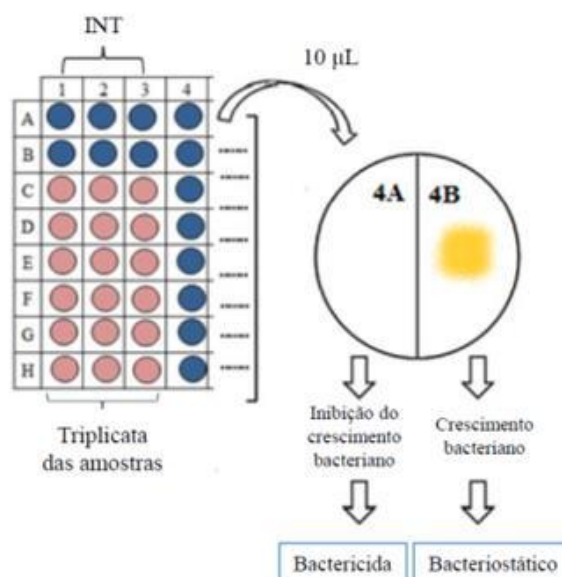
Após a organização do ensaio anteriormente descrito, as placas de microtitulação foram incubadas a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, por 16 a 20 horas, em aerobiose. Em seguida, foram realizadas as leituras dos ensaios com adição de 20 μL de solução aquosa de cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazólio (INT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) na concentração de 1 mg/mL adicionado em todos os poços, com exceção das colunas correspondentes a quadruplicata das amostras, cujos conteúdos foram utilizados para a determinação da CBM e para a classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático. Após a adição do indicador biológico, as placas de microtitulação foram incubadas em estufa bacteriológica por 30 min adicionais a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, em aerobiose. Após incubação, os poços onde foi observada turvação com coloração bordô ou castanho-avermelhada indicavam crescimento bacteriano. A

CIM foi determinada como "a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um micro-organismo em um teste de sensibilidade em caldo", conforme conceito descrito no documento M07-A10 (CLSI, 2015).

4.4.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático

A partir do conteúdo dos poços das quadruplicatas das placas de microtitulação que não receberam a solução de INT (indicador biológico) e dos quais não foi observado crescimento bacteriano no procedimento descrito no item 4.4.1, foram retirados 10 µL com auxílio de uma micropipeta e transferidos para placas de Petri contendo AMH (Difco[®] Laboratories, Spark, MD, USA). Estas placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C, por 16 a 20 horas, em aerobiose. Após esse período de incubação, procedeu-se a leitura das placas, analisando, visualmente, a presença ou ausência de crescimento de colônias bacterianas. Desta forma, as concentrações dos extratos testados que permitiram o crescimento bacteriano no AMH foram definidas como bacteriostáticas e aquelas que inibiram o crescimento bacteriano foram definidas como bactericidas, conforme demonstrado na Figura 19. A CBM foi definida como sendo a menor concentração capaz de impedir o crescimento bacteriano no AMH.

Figura 19 - Esquema ilustrativo do procedimento para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático



Fonte: Adaptado de Santana (2015)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro* DOS EXTRATOS METANÓLICOS OBTIDOS DE DIFERENTES PARTES DE PLANTAS PROCEDENTES DA ILHA DA MADEIRA E AÇORES, PORTUGAL

Inicialmente, conforme descrito no item 4.4, a atividade antibacteriana *in vitro* de vinte extratos metanólicos obtidos de diferentes partes de plantas procedentes da Ilha da Madeira e Açores, Portugal, inclusive *R. grandifolius*, foi investigada por meio da determinação da CIM e do estabelecimento da CBM seguida da classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático frente à *S. aureus* (ATCC 6538, ATCC 25923 e ATCC 29213), *E. coli* (ATCC 10536 e ATCC 25922), *S. Choleraesuis* (ATCC 10708), *S. Typhimurium* (ATCC 13311) e *P. aeruginosa* (ATCC 9027 e ATCC 27853). Os valores de CIM obtidos estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Valores da Concentração Inibitória Mínima dos extratos metanólicos de diferentes partes de plantas provenientes da Ilha da Madeira e Açores, Portugal, e de ampicilina e cloranfenicol frente cepas ATCC®

Extrato Metanólico/Antibiótico		Parte da Planta	Cepa Bacteriana / Concentração Inibitória Mínima (CIM) (µg/mL)								
Família	Gênero + Espécie		<i>S. aureus</i> 6538	<i>S. aureus</i> 29213	<i>S. aureus</i> 25923	<i>E. coli</i> 10536	<i>E. coli</i> 25922	<i>S. Choleraesuis</i> 10708	<i>S. Typhimurium</i> 13311	<i>P. aeruginosa</i> 9027	<i>P. aeruginosa</i> 27853
Myricaceae	<i>Myrica faya</i>	Fruto	5000*	> 5000	> 5000	5000*	5000*	5000*	5000*	> 5000	> 5000
Myricaceae	<i>Myrica faya</i>	Folha	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
Rosaceae	<i>Rubus grandifolius</i>	Fruto	2500*	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	5000**	5000**
Rosaceae	<i>Rubus grandifolius</i>	Folha	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
Adoxaceae	<i>Sambucus lanceolata</i>	Fruto	5000*	> 5000	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	5000**	5000*
Ericaceae	<i>Vaccinium cylindraceum</i>	Fruto	5000*	> 5000	5000*	5000*	5000*	5000*	5000*	5000**	> 5000
Ericaceae	<i>Vaccinium cylindraceum</i>	Folha	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
Ericaceae	<i>Vaccinium padifolium</i>	Fruto	> 5000	> 5000	> 5000	5000*	> 5000	> 5000	5000*	> 5000	> 5000
Ericaceae	<i>Vaccinium padifolium</i>	Folha Nova	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
Ericaceae	<i>Vaccinium padifolium</i>	Folha Madura	5000*	> 5000	5000*	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
Plantaginaceae	<i>Sibthorpia peregrina</i>	Folha	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
Leguminosae	<i>Ulex europaeus</i>	Folha	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
Leguminosae	<i>Ulex europaeus</i>	Flor	5000*	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
Compositae	<i>Helichrysum melaleucum</i>	Folha	5000*	> 5000	> 5000	5000*	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
Compositae	<i>Helichrysum melaleucum</i>	Flor	5000*	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
Compositae	<i>Helichrysum obconicum</i>	Folha	5000*	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
Compositae	<i>Helichrysum devium</i>	Folha	2500*	5000*	5000*	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
Compositae	<i>Artemisia argentea</i>	Folha	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
Aquifoliaceae	<i>Ilex perado</i>	Folha	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
Exobasidiaceae	<i>Laurobasidium lauri</i>	Fruto	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
Não se aplica	AMP	Não se aplica	< 4	< 4 ^a	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	> 500	> 500 ^d
Não se aplica	CHL	Não se aplica	8	8 ^b	8	< 4	< 4	< 4	< 4	125	250 ^d

AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol. > 5000 µg/mL = valores de CIM acima da maior concentração testada; os valores da CIM obtidos com AMP e CHL estão de acordo com os intervalos de controle de qualidade reportados para organismos não fastidiosos pelo CLSI (2020), conforme documento M100-S30: (a) 0,0005-0,002 µg/mL; (b) 0,002-0,0016 µg/mL; (c) 0,002-0,008 µg/mL; (d) não reportado; * = efeito bacteriostático e ** = efeito bactericida. Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Pela análise da Tabela 11 observa-se que, dos vinte extratos metanólicos, onze foram ativos frente a pelo menos uma das cepas testadas: *M. faya* (fruto); *R. grandifolius* (fruto), *S. lanceolata* (fruto); *V. cylindraceum* (fruto); *V. padifolium* (fruto); *V. padifolium* (folha madura); *U. europaeus* (flor), *H. melaleucum* (folha), *H. melaleucum* (flor), *H. obconicum* (folha) e *H. devium* (folha). Por outro lado, não foi possível determinar a CIM para os outros nove extratos em função do gradiente de concentração estabelecido (4 - 5000 µg/mL). Para esses casos, o resultado da determinação da CIM foi expresso como > 5000 µg/mL.

Para seleção do extrato metanólico que se tornou objeto do presente estudo foi considerada a atividade sobre as cepas (ativo ou inativo), o nº de cepas inibidas, o valor da CIM (menor concentração capaz de inibir o crescimento visível das bactérias que compuseram o painel) e o efeito antibacteriano observado (preferencialmente bactericida). Assim, entre os onze extratos que foram ativos frente a pelo menos uma das nove cepas testadas, optou-se pelo extrato metanólico dos frutos de *R. grandifolius*, que foi efetivo sobre todas essas cepas, com CIM variando de 2500 [*S. aureus* (ATCC 6538)] a 5000 µg/mL (demais cepas) e efeito bactericida sobre as duas cepas de *P. aeruginosa* testadas.

Até novembro de 2021, após uma extensa revisão da literatura desde o início do presente estudo, não foi localizada nenhuma publicação referente à atividade antibacteriana *in vitro* de *R. grandifolius* ou *R. serrae*, o que demonstra o ineditismo deste estudo (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=antimicrobial+activity+of+Rubus+grandifolius>; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=antibacterial+activity+of+Rubus+grandifolius>, acesso em 30 nov 2021). Quando pesquisada a atividade antibacteriana do gênero *Rubus*, o resultado da busca revelou um número expressivo de 942 resultados, o que demonstra que esse gênero e suas espécies são considerados um interessante e atraente tema de investigação, sendo bastante explorado (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/?term=antibacterial+activity+of+Rubus>, acesso em 26 set 2021).

Em 2012, Seeram já descrevia que não é surpreendente que estes frutos venham atraindo pesquisas significativas e a atenção do público. Segundo este autor, isso ocorre porque estes pequenos frutos macios contêm vários constituintes da dieta conhecidos por serem essenciais para a saúde humana, como fibras, vitaminas, minerais e ácido fólico. Separado desses macro e micronutrientes, frutas vermelhas também contêm fitoquímicos comumente chamados fitonutrientes, compostos de plantas bioativas que podem fornecer benefícios à saúde além da nutrição básica, o que reforça a relevância do presente estudo.

Esta triagem inicial da atividade antibacteriana *in vitro* dos vinte extratos metanólicos revelou que cinco deles foram capazes de inibir o crescimento tanto de cepas Gram-positivas

quanto de Gram-negativas, com atividade antibacteriana considerada fraca segundo a classificação de Kuete (2010) (CIM de 2500 e 5000 µg/mL). Segundo este autor, a atividade antibacteriana de extratos de plantas pode ser classificada como significativa (CIM < 100 µg/mL), moderada (100 µg/mL < CIM ≤ 625 µg/mL) ou fraca (CIM > 625 µg/mL) (KUETE, 2010). Porém, considerando o saber popular e a aplicação das espécies vegetais na Medicina Alternativa e Complementar, foram realizados, adicionalmente, ensaios de CIM e CBM empregando cepas clínicas humanas mencionadas no item 4.4 (pág. 59). Todos os extratos vegetais que foram ativos frente a pelo menos duas cepas ATCC® foram selecionados para este ensaio e conseqüente determinação da CIM (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores da Concentração Inibitória Mínima dos cinco extratos metanólicos de diferentes partes de plantas provenientes da Ilha da Madeira e Açores, Portugal, e de ampicilina, cloranfenicol e levofloxacina frente às quatro cepas clínicas testadas

Extrato metanólico/ANT	Parte da Planta	Cepa Clínica Bacteriana / Concentração Inibitória Mínima (CIM) (µg/mL)			
		MRSA 1485279	<i>Salmonella</i> spp. 1507708	<i>E. coli</i> 2856403	<i>P. aeruginosa</i> 2854386
<i>Myrica faya</i>	Fruto	> 5000	> 5000	5000*	NT
<i>Rubus grandifolius</i>	Fruto	5000*	5000*	5000*	5000**
<i>Sambucus lanceolata</i>	Fruto	5000*	5000*	5000*	5000**
<i>Vaccinium cylindraceum</i>	Fruto	> 5000	5000*	5000*	5000*
<i>Helichrysum melaleucum</i>	Folha	> 5000	NT	> 5000	NT
AMP	Não se aplica	500	500	> 500	> 500
CHL	Não se aplica	125	8	< 4	250
LEVO	Não se aplica	NT	8	32	NT

ANT: antibiótico; AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; LEVO: levofloxacina; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina; NT: Não Testado (material insuficiente); > 5000 = valores de CIM acima da maior concentração testada; * = efeito bacteriostático e ** = efeito bactericida.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

A Tabela 12 permite observar que os extratos metanólicos dos frutos de *R. grandifolius* e *S. lanceolata* foram os mais efetivos, sendo ativos frente a todas as cepas testadas com valor de CIM de 5000 µg/mL e efeito bactericida para *P. aeruginosa* 2854386. Vale ressaltar que estas cepas foram isoladas de hemoculturas de pacientes atendidos no HUCFF/UFRJ, e conforme ilustram as Figuras 12, 13, 14 e 15 (pág. 62 - 65), o TSA demonstrou a possibilidade da utilização de poucas opções terapêuticas para condução dos processos infecciosos, com exceção de *P. aeruginosa* 2854386, que se mostrou mais sensível aos ANTs testados.

Krzepiłko, Prazak e Świeciło (2021) avaliaram o efeito antibacteriano de folhas de *R. idaeus* variedades *Cascade Delight*, *Glen Fyne* e *Octavia*, *Rubus fruticosus* sem espinho variedade *Navaho* e o híbrido *R. idaeus* + *R. fruticosus*, coletados no início de março durante a fase de abertura do botão, sobre *S. aureus*. Estes autores empregaram o método de difusão em ágar, que apesar de todas as limitações conhecidas do método, demonstraram que as três amostras exibiram atividade antibacteriana contra cepas de referência *S. aureus* PCM 2267, *Enterococcus faecalis* PCM 2786 e *Enterobacter aerogenes* PCM 1836. Dadas as devidas proporções, o extrato metanólico de *R. grandifolius* foi efetivo frente à *S. aureus* [(ATCC 6538; CIM = 2500 µg/mL), (ATCC 29213; CIM = 5000 µg/mL) e (ATCC 25923; CIM = 5000 µg/mL)], sendo a atividade antibacteriana considerada fraca (KUETE, 2010). Um aspecto crítico a ser considerado é o tempo de armazenamento do extrato testado. Acreditamos que o preparo do extrato de frutos e folhas frescas de *R. grandifolius* conduziria a valores mais significativos da atividade antibacteriana. Ainda neste caso, existe a possibilidade dessa propriedade antibacteriana ser potencializada sob a forma de nanopartículas (NPs) utilizando, inclusive, uma grande variedade de matrizes. Nesse contexto, recentemente, a biossíntese de nanopartículas utilizando diversas matrizes, por exemplo óxido de zinco (ZnO NPs), a partir de extratos brutos e fitoquímicos tem atraído a atenção de inúmeros pesquisadores. Este foi o foco do estudo realizado por Rajendran e colaboradores (2021), que efetuaram a biossíntese de ZnO NPs a partir de extratos brutos e fitoquímicos. Segundo estes autores, a síntese verde de NPs é econômica, ecológica e uma alternativa promissora para síntese química. O estudo de Rajendran e colaboradores (2021) envolveu a síntese de NPs de ZnO usando extrato de acetona da raiz de *Rubus fairholmianus* (RE) como um agente redutor eficiente. Estes autores testaram RE, RE-ZnO NPs e ampicilina frente a *S. aureus* (ATCC BAA-1026) e obtiveram como valores de CIM 337,86, 157,22 e 0,79 µg/mL, nessa ordem. Ainda que a CIM da RE-ZnO NP tenha sido cerca de 50% inferior à do RE, a atividade antibacteriana é considerada moderada segundo Kuete (2010).

A atividade antibacteriana *in vitro* frente a *S. aureus* e *E. coli* testadas no presente estudo também foi reportada por Weli e colaboradores (2020). Estes autores, utilizando extratos com diferentes polaridades (hexânico, clorofórmico, acetato de etila e hidroetanólico) de folhas de *R. fruticosus* avaliaram a propriedade antibacteriana frente as cepas clínicas de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *Haemophilus influenzae* pelo método de difusão em ágar. Weli e colaboradores (2020) impregnaram discos de 5 mm com concentrações dos extratos que variaram de 250 a 2000 µg/mL. Os extratos foram mais ativos frente a *E. faecalis* (clorofórmico:

10 ± 0,09 mm) e *E. coli* (acetato de etila: 21 ± 0,71 mm), com exceção de *S. aureus*, que praticamente não foi inibido, e mais efetivos na concentração de 2000 µg/mL.

Em 2017, Četojević-Simin e colaboradores avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato metanólico do bagaço de *R. fruticosus* variedade Čačanska bestrna e reportaram que *S. aureus* (ATCC 11632; CIM = 390 µg/mL), *P. aeruginosa* (ATCC 27853; CIM = 390 µg/mL) e *P. aeruginosa wild strain* (CIM = 780 µg/mL) mostraram-se mais sensíveis entre as cepas testadas. Estes autores também investigaram *E. coli* (ATCC 10536; CIM = 780 µg/mL), *E. coli wild strain* (CIM = 780 µg/mL), *S. Typhimurium* (ATCC 14028; CIM = 1170 µg/mL) e *Salmonella spp. wild strain* (CIM = 1170 µg/mL). Em termos de perfil, estes resultados foram similares aos observados em nosso estudo. Conforme apresentam as Tabelas 11 e 12 do presente estudo, o extrato metanólico do fruto de *R. grandifolius* também foi capaz de inibir o crescimento de cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *S. Cholerasuis*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*. Vale ressaltar que os dados de Četojević-Simin e colaboradores revelaram efeito bacteriostático frente a *P. aeruginosa* (ATCC 27853) enquanto nossos achados, apesar de valores de CIM maiores, demonstraram efeito bactericida.

Anteriormente, em 2004, Thiem e Goślińska investigaram a atividade antimicrobiana da fração butanólica de folhas de *Rubus chamaemorus* e do ácido elágico frente às cepas Gram-positivas [*S. aureus* (ATCC 9538), *Staphylococcus epidermidis* (NCTC 11047), *Micrococcus luteus* (NCTC 9341) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)], Gram-negativas (*E. coli* NCTC 8196) e levedura [*Candida albicans* (ATCC 10231)]. Entre os resultados obtidos por estes autores, nota-se que os valores de CIM frente à *S. aureus* (ATCC 9538) foi de 580 e 630 µg/mL com a fração butanólica e ácido elágico, respectivamente, e de 2330 e 2500 µg/mL frente à *E. coli*, nessa ordem. No presente estudo, observou-se valores de CIM de 2500 e 5000 µg/mL para *S. aureus* e de 5000 µg/mL para *E. coli*. As variações detectadas entre as investigações podem ser influenciadas por diversas condições ambientais, onde a expressão das substâncias ativas pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007) e também pelo método de extração, principalmente a escolha do solvente devido a sua polaridade (EDDINE; REDHA; LADJEL, 2016).

Sob o ponto de vista químico, de acordo com Golovinskaia e Wang (2021), os principais fitoquímicos nas frutas vermelhas são compostos fenólicos, incluindo flavonoides (antocianinas, flavonois, flavonas, flavanois, flavanonas e isoflavonoides), taninos e ácidos fenólicos, o que foi observado no presente estudo. Neste recente artigo de revisão, estes autores

descrevem que, uma vez que os frutos têm uma alta concentração de polifenóis, é possível usá-los farmacologicamente no tratamento de várias doenças (GOLOVINSKAIA; WANG, 2021).

Como apresentado anteriormente na Revisão da Literatura, muitas plantas produzem metabólitos secundários antimicrobianos como parte de seu processo normal de crescimento e resposta a ataques de patógenos. Neste contexto, *Ribes nigrum* (amoras pretas) são frutas vermelhas atraentes, com sua cor característica sendo fornecida por antocianinas roxas, o mais prevalente dos flavonoides nessas frutas, que contêm vários polifenólicos, principalmente antocianinas, e também AHC, flavanois e flavonois, junto com vitamina C e minerais. Parkar e colaboradores (2014), ao trabalharem com *R. nigrum*, reportaram que o suco de amoras pretas possuía propriedade antimicrobiana e que suas antocianinas eram capazes de inibir a adesão da *S. Typhimurium* às células epiteliais de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) em até 39%, revelando a ação dessas frutas sobre essa bactéria. No presente estudo, foram testadas *S. Cholerasuis*, *S. Typhimurium* e *Salmonella* spp. 1507708 isolada de hemocultura frente ao extrato metanólico de *R. grandifolius*, que foi capaz de inibir o crescimento das três cepas com CIM de 5000 µg/mL e efeito bacteriostático, dados indiretamente corroborados por Parkar e colaboradores (2014) visto que esses autores demonstraram a capacidade de inibição da adesão de *S. Typhimurium*.

Recentemente, Vara e colaboradores (2020) elaboraram um desenho de estudo visando caracterizar detalhadamente a composição nutricional e antocianinas em *R. idaeus* variedade *Kweli* procedente do norte de Portugal e avaliar sua atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro*. Microbiologicamente, estes autores empregaram uma mistura de etanol:água (80:20; v/v) acidificada com ácido cítrico (até pH 3) dos frutos para avaliar a propriedade antimicrobiana desse extrato frente a bactérias e fungos. A atividade antibacteriana foi testada contra *Bacillus cereus* isolado de alimento, *Listeria monocytogenes* NCTC 7973, *E. coli* (ATCC 25922) e *S. Typhimurium* (ATCC 13311). Vara e colaboradores (2020) observaram CIM igual a 3120 µg/mL para *E. coli* e *S. Typhimurium*, dados que revelam diferença de cerca de uma ordem para os nossos resultados. Ainda sob o aspecto microbiológico, vale lembrar que a atividade antibacteriana dos compostos fenólicos é conhecida e bem estabelecida o que justificaria o efeito antibacteriano observado com os frutos de *R. grandifolius*. Assim, para a melhor compreensão desta atividade provavelmente associada à presença destes compostos, os extratos metanólicos de folhas e frutos de *R. grandifolius* foram quimicamente caracterizados.

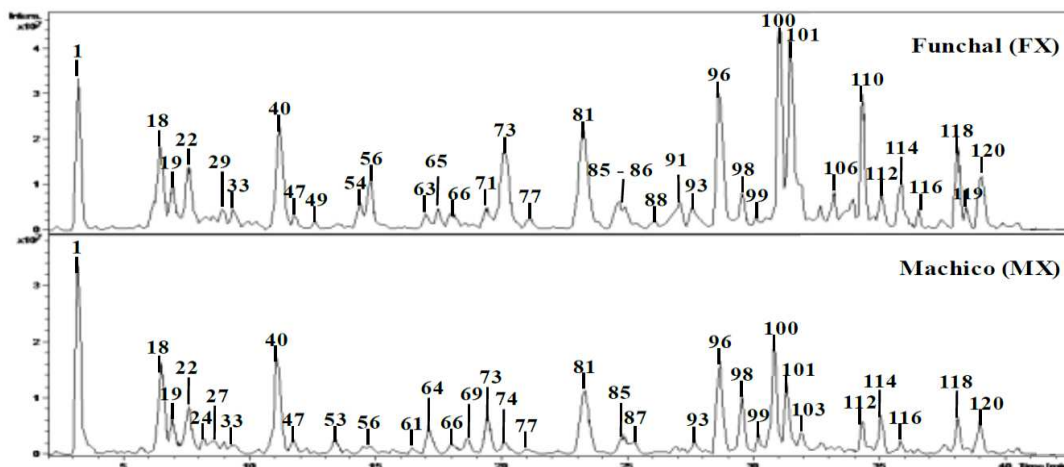
5.2 INVESTIGAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE FOLHAS E FRUTOS DE *Rubus grandifolius* POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY* (CLAE-DAD-ESI/EMⁿ)

As folhas e frutos de *R. grandifolius* possuem uma grande e diversificada variedade de fitoconstituintes, dentre eles merecem destaque os compostos fenólicos (antocianinas, flavonóis, flavanois, elagitaninos e ácidos fenólicos) (GOUVEIA-FILGUEIRA; CASTILHO, 2015). A análise do perfil fitoquímico dos extratos de folhas e frutos de *R. grandifolius* foi realizada em duas amostras coletadas em dois locais geograficamente diferentes da ilha da Madeira, Funchal e Machico, resultando em 122 compostos, incluindo antocianinas, outros flavonoides, ácidos fenólicos, terpenoides, cumarinas e ácidos orgânicos. Vale ressaltar que apenas os compostos mais abundantes foram numerados por uma questão de clareza. A identificação dos picos foi feita através da comparação dos espectros de fragmentação (MSⁿ), utilizando-se padrões autênticos (quando disponíveis) e pela comparação desses fragmentos com a literatura científica. Os resultados demonstrados nos itens 5.2.1 e 5.2.2 foram retirados do trabalho realizado por Spínola (2018) e aqui foram reescritos com consentimento dos autores.

5.2.1 Perfis cromatográficos dos extratos metanólicos das folhas e frutos de *Rubus grandifolius* no modo negativo de ionização

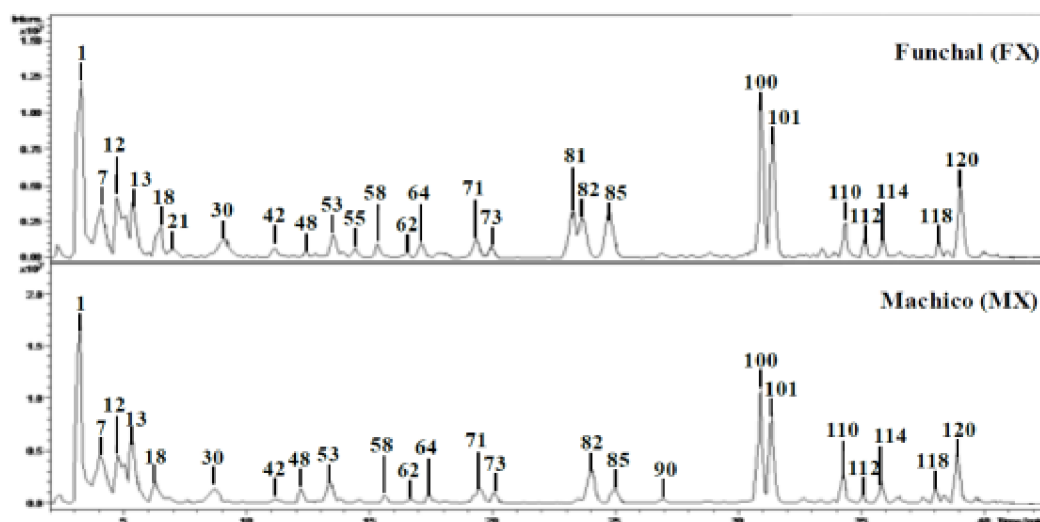
As Figuras 20 e 21 representam os cromatogramas dos extratos metanólicos das folhas e frutos de *R. grandifolius*, respectivamente, coletados em dois locais diferentes, analisados no modo negativo de ionização. A identificação dos picos apresentados nas Figuras 20 e 21 está demonstrada na Tabela 13. Em geral, no espectro MS¹ do modo negativo de ionização (ESI⁻), o pico mais intenso correspondeu ao íon molecular desprotonado [M-H]⁻; isso permitiu realizar um maior número de análises de MSⁿ. A maioria dos compostos foi observada na sua forma glicosilada. Os espectros de massa dos compostos fenólicos conjugados mostraram o íon aglicona como resultado da perda de porções de açúcar como glicuronil, hexosil, desoxihexosil, pentosil e rutinosil (-176, -162, -146, -132 e -308 Da, respectivamente).

Figura 20 - Cromatogramas obtidos por CLAE-ESI/EMⁿ dos extratos metanólicos das folhas de *Rubus grandifolius* coletados em Funchal (FX) e Machico (MX)



Fonte: Spínola (2018).

Figura 21 - Cromatogramas obtidos por CLAE-ESI/EMⁿ dos extratos metanólicos dos frutos de *Rubus grandifolius* coletados em Funchal (FX) e Machico (MX)



Fonte: Spínola (2018).

Tabela 13- Caracterização por CLAE-ESI/EMⁿ dos fitoconstituintes dos extratos metanólicos de *Rubus grandifolius* (FX: Funchal; MX: Machico)

N ^o	<i>t_R</i> (min)	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	CLAE-DAD-ESI/EM ⁿ <i>m/z</i> (% pico base)	Identificação atribuída	Frutos		Folhas	
					FX	MX	FX	MX
1	3.2	683	MS ² [683]: 341 (100) MS ³ [683→341]: 179 (100), 161 (23.0), 143 (33.1), 119 (16.9), 113 (45.2)	Polímero de hexose	✓	✓	✓	✓
3	3.8	353	MS ² [353]: 173 (100), 155 (11.5), 111 (21.5) MS ³ [353→173]: 155 (17.9), 111 (100)	Cafeoilisocitrato	✓	✓		
4	3.4	515	MS ² [515]: 341 (100) MS ³ [515→341]: 179 (100), 161 (33.9), 149 (15.2), 119 (46.9), 131 (25.1), 113 (28.5)	Sacarídeo (Dihexose + Ácido quinico)			✓	✓
5	3.5	533	MS ² [533]: 191 (100) MS ³ [533→191]: 173 (100), 153 (18.0), 127 (91.3), 109 (36.1), 93 (55.0), 85 (99.5)	Derivado do ácido quinico				✓
6	3.6	341	MS ² [341]: 179 (100), 161 (34.0), 149 (23.7), 119 (33.5)	Sacarídeo (dihexose)			✓	
7	3.8	191	MS ² [191]: 173 (100), 111 (36.5) MS ³ [191→173]: 155 (21.2), 111 (100)	Ácido cítrico	✓	✓		✓
8	4.0	133	MS ² [133]: 115 (100) MS ³ [133→115]: 71 (100)	Ácido málico				✓
9	4.2	481	MS ² [481]: 301 (100) MS ³ [481→301]: 275 (100), 257 (29.3)	Hexahidroxidifenoil- <i>O</i> -hexosídeo				✓
11	4.5	371	MS ² [371]: 353 (82.6), 197 (49.2), 191 (47.7), 179 (12.8), 173 (48.5), 153 (22.8), 135 (100) MS ³ [371→197]: 179 (77.7), 153 (100), 135 (88.1)	Derivado de ácido cafeico/siringico			✓	✓
14	5.5	707 [2M-H] ⁻	MS ² [707]: 615 (27.4), 533 (48.1), 353 (100), 339 (37.7), 315 (38.3), 271 (62.7), 243 (11.2) MS ³ [707→353]: 191 (100), 179 (30.3)	Dímero de ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquinico				✓
15	5.7	783	MS ² [783]: 617 (14.7), 481 (43.0), 301 (100), 275 (11.0) MS ³ [783→301]: 257 (100), 257 (47.0), 185 (86.0)	Pedunculagina I			✓	✓
16	5.7	369	MS ² [369]: 191 (11.8), 173 (100), 111 (23.2) MS ³ [369→173]: 155 (16.1), 111 (100)	Derivado do ácido cítrico	✓	✓		
18	6.4	353	MS ² [353]: 191 (100), 179 (43.5), 135 (17.2) MS ³ [353→191]: 173 (48.4), 127 (100), 109 (16.5), 93 (68.1), 85 (70.8)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquinico	✓	✓	✓	✓
19	6.7	341	MS ² [341]: 251 (20.5), 233 (27.2), 203 (19.0), 179 (100), 161 (27.3), 135 (19.6) MS ³ [341→179]: 135 (100)	Ácido cafeico- <i>O</i> -hexosídeo	✓	✓	✓	✓
21	6.9	783	MS ² [783]: 618 (10.3), 617 (45.1), 481 (15.0), 302 (14.2), 301 (100), 257 (24.9) MS ³ [783→301]: 284 (70.2), 257 (100)	Pedunculagina I	✓	✓		✓
22	7.4	341	MS ² [341]: 281 (93.1), 251 (100), 221 (31.9), 179 (76.6) MS ³ [341→179]: 135 (100)	Ácido cafeico- <i>O</i> -hexosídeo			✓	✓
24	8.2	297	MS ² [297]: 179 (100), 135 (15.9) MS ³ [297→179]: 135 (100)	Derivado do ácido cafeico			✓	✓
27	8.7	537	MS ² [537]: 353 (100), 191 (12.3), 165 (11.0) MS ³ [537→353]: 191 (100), 165 (58.0), 127 (100), 111 (51.5), 93 (53.9), 85 (45.5)	Ácido salvianólico			✓	✓
29	9.0	707	MS ² [707]: 354 (11.3), 353 (100)	Dímero de ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquinico			✓	

Tabela 13 (Continuação) - Caracterização por CLAE-ESI/EMⁿ dos fitoconstituintes dos extratos metanólicos de *Rubus grandifolius* (FX: Funchal; MX: Machico)

		[2M-H] ⁻	MS ³ [707→353]: 191 (31.7), 179 (12.2), 173 (100), 135 (38.4)					
31	9.2	457	MS ² [457]: 439 (37.2), 341 (100), 281 (34.1), 179 (16.8) MS ³ [457→341]: 281 (80.1), 251 (100), 221 (20.9), 179 (50.9), 135 (35.0)	Ácido málico-cafeoilhexosídeo			✓	✓
32	9.5	577	MS ² [577]: 519 (11.4), 451 (32.6), 425 (100), 407 (96.4), 289 (20.0) MS ³ [577→425]: 407 (100), 339 (18.8), 285 (25.4)	Procianidina (tipo B)				✓
33	9.5	431	MS ² [431]: 385 (100), 223 (12.2) MS ³ [431→385]: 223 (33.1), 205 (40.5), 161 (13.3), 153 (100)	Roseosídeo (Aduto formado)			✓	✓
34	9.6	355	MS ² [355]: 193 (100) MS ³ [355→193]: 149 (62.1), 134 (100)	Ácido ferúlico- <i>O</i> -hexosídeo		✓		
35	10.0	565	MS ² [565]: 520 (19.7), 519 (100), 341 (10.8) MS ³ [565→519]: 388 (18.3), 341 (100), 179 (44.7), 161 (33.6), 113 (25.0)	Sacarídeo		✓		✓
37	10.3	635	MS ² [635]: 466 (24.3), 465 (100) MS ³ [635→465]: 314 (11.6), 313 (100), 241 (12.5), 235 (10.2), 211 (12.8), 169 (63.3) MS ⁴ [635→465→313]: 205 (22.6), 193 (46.6), 169 (100), 125 (35.6)	Trigaloil- <i>O</i> -hexosídeo				✓
38	10.4	373	MS ² [373]: 337 (100), 319 (23.0), 293 (10.4), 277 (27.9) MS ³ [373→337]: 293 (100), 277 (90.4), 237 (82.9), 219 (62.8), 177 (38.0), 165 (17.1)	Desconhecido				✓
39	10.8	289	MS ² [289]: 246 (20.6), 245 (100), 179 (20.7), 105 (32.6) MS ³ [289→245]: 227 (27.8), 203 (100), 185 (22.3), 175 (66.2), 161 (22.4)	Catequina				✓
40	11.0	355	MS ² [355]: 309 (33.1), 161 (100) MS ³ [355→161]: 133 (100), 117 (10.9)	Derivado de ácido ferúlico			✓	✓
41	11.1	565	MS ² [565]: 324 (11.8), 323 (100), 211 (15.2) MS ³ [565→323]: 280 (12.0), 262 (11.4), 211 (100), 139 (17.5), 124 (15.9)	Desconhecido		✓	✓	
42	11.2	477	MS ² [477]: 302 (22.8), 301 (100) MS ³ [477→301]: 283 (57.6), 257 (100)	Ácido elágico- <i>O</i> -glicuronídeo		✓	✓	
43	11.3	637	MS ² [637]: 356 (10.0), 355 (100), 179 (18.3) MS ³ [637→355]: 161 (100), 149 (14.4), 119 (26.8)	Sacarídeo				✓
44	11.6	537	MS ² [537]: 519 (100), 341 (11.1), 281 (14.5), 179 (100) MS ³ [537→519]: 357 (12.9), 341 (76.0), 325 (51.4), 295 (77.4), 179 (100), 135 (49.7)	Derivado de ácido cafeico- <i>O</i> -hexosídeo				✓
45	11.7	401	MS ² [401]: 301 (20.3), 289 (100), 215 (10.6) MS ³ [401→289]: 245 (100), 205 (52.2), 203 (13.2), 179 (16.6)	Derivado de catequina				✓
46	12.0	513	MS ² [513]: 433 (20.2), 401 (100), 301 (14.1), 291 (10.3), 257 (8.8), 215 (15.0) MS ³ [513→401]: 301 (52.6), 289 (100), 215 (16.9), 195 (20.5) MS ⁴ [513→401→289]: 245 (100), 188 (15.6), 175 (26.0), 151 (18.6)	Derivado de catequina				✓
47	12.3	557	MS ² [557]: 513 (19.6), 445 (100), 255 (21.5), 211 (14.5) MS ³ [557→445]: 383 (28.1), 301 (47.0), 289 (100), 257 (35.2), 247 (22.9), 215 (47.8), 205 (20.4), 196 (12.1) MS ⁴ [557→445→289]: 245 (100), 205 (71.4)	Derivado de catequina				✓
48	12.4	477	MS ² [477]: 301 (100) MS ³ [477→301]: 257 (100), 245 (40.4)	Ácido elágico- <i>O</i> -glicuronídeo		✓	✓	
49	12.5	537	MS ² [537]: 519 (100) MS ³ [537→519]: 281 (69.6), 265 (22.3), 217 (22.1), 179 (100), 135 (47.6)	Derivado do ácido cafeico				✓
50	12.5	433	MS ² [433]: 301 (100), 300 (62.7) MS ³ [433→301]: 257 (100)	Ácido elágico- <i>O</i> -pentosídeo			✓	
51	12.8	393	MS ² [393]: 358 (25.2), 348 (21.5), 347 (100), 289 (14.9), 179 (21.5) MS ³ [393→347]: 329 (71.6), 161 (100), 119 (33.4)	Sacarídeo		✓		
52	13.1	493	MS ² [493]: 449 (22.0), 331 (100), 315 (14.5), 299 (26.7), 287 (32.1), 271 (37.4), 169 (31.3)	Galoil- <i>O</i> -dihexosídeo			✓	✓

Tabela 13 (Continuação) - Caracterização por CLAE-ESI/EMⁿ dos fitoconstituintes dos extratos metanólicos de *Rubus grandifolius* (FX: Funchal; MX: Machico)

			MS ³ [493→331]: 169 (100), 125 (37.3)							
53	13.5	935	MS ² [935]: 915 (15.2), 897 (31.2), 633 (100), 301 (80.2) MS ³ [935→633]: 469 (11.8), 315 (12.8), 302 (14.7), 301 (100) MS ⁴ [935→633→301]: 300 (17.5), 285 (29.8), 257 (56.1), 229 (100), 201 (50.9), 186 (53.5)	Casuarinina		✓	✓	✓	✓	
54	14.4	537	MS ² [537]: 519 (44.5), 490 (26.1), 489 (100), 323 (24.3) MS ³ [537→489]: 324 (12.3), 323 (100), 221 (26.7), 179 (26.6), 161 (12.7), 135 (53.0)	Derivado do ácido cafeico				✓	✓	
55	14.4	595	MS ² [595]: 463 (100), 434 (12.1), 433 (47.5), 301 (18.5) MS ³ [595→463]: 301 (100), 179 (55.2), 151 (28.4)	Quercetina- <i>O</i> -(pentosil)hexosídeo	✓	✓				
56	14.9	493	MS ² [493]: 433 (20.1), 425 (10.6), 341 (57.1), 232 (26.3), 281 (62.9), 251 (81.3), 221 (45.7), 179 (100) MS ³ [493→179]: 135 (100)	Ácido cafeico- <i>O</i> -galoilhexosídeo				✓	✓	
57	15.1	595	MS ² [595]: 463 (15.5), 301 (100) MS ³ [595→301]: 271 (45.5), 179 (50.2), 151 (100)	Quercetina- <i>O</i> -(pentosil)hexosídeo				✓	✓	
58	15.4	433	MS ² [433]: 301 (100) MS ³ [433→301]: 300 (74.7), 258 (12.1), 257 (100), 229 (49.4), 217 (17.3)	Ácido elágico- <i>O</i> -pentosídeo	✓	✓	✓	✓		
59	15.7	739	MS ² [739]: 629 (17.1), 587 (100), 569 (21.2), 449 (15.4), 435 (40.8), 417 (16.2), 339 (22.0), 289 (14.5) MS ³ [739→587]: 569 (54.8), 477 (32.4), 459 (30.9), 435 (93.1), 417 (100), 339 (43.4), 325 (35.1), 299 (21.0), 177 (23.0) MS ⁴ [739→587→339]: 337 (100), 177 (87.6)	Desconhecido					✓	
60	15.9	457	MS ² [457]: 296 (13.2), 295 (100) MS ³ [457→295]: 180 (18.7), 179 (37.0), 149 (24.7), 133 (39.4), 119 (100), 113 (57.4)	Sacarídeo					✓	
61	16.4	513	MS ² [513]: 427 (100), 361 (49.5), 301 (52.4), 300 (19.1), 289 (80.4), 257 (29.7) MS ³ [513→301]: 257 (100)	Derivado de ácido elágico					✓	
62	16.6	491	MS ² [491]: 315 (100), 300 (25.6) MS ³ [491→315]: 301 (25.5), 300 (100)	Isorhamnetina- <i>O</i> -glicuronídeo	✓	✓				
63	16.9	549	MS ² [549]: 503 (100), 311 (28.7), 221 (15.1), 191 (22.3) MS ³ [549→503]: 459 (26.5), 311 (53.2), 293 (28.4), 281 (18.0), 275 (30.0), 251 (13.3), 239 (36.2), 221 (100), 191 (35.3), 161 (10.4), 143 (18.0)	Desconhecido					✓	
64	17.2	609	MS ² [609]: 301 (100), 300 (50.8) MS ³ [609→301]: 179 (54.3), 151 (100)	Quercetina- <i>O</i> -rutinosídeo (Rutina)	✓	✓	✓	✓		
65	17.5	645	MS ² [645]: 475 (100), 301 (23.9) MS ³ [645→475]: 323 (97.1), 313 (100), 179 (29.7) MS ⁴ [645→475→323]: 179 (12.8), 161 (22.7), 135 (100)	Derivado do ácido cafeico					✓	
66	17.8	509	MS ² [509]: 491 (100), 473 (30.0), 461 (42.3), 367 (64.3), 313 (22.7), 311 (36.1) MS ³ [509→367]: 339 (100), 313 (25.1), 149 (58.4) MS ³ [509→491]: 473 (100), 462 (25.7), 461 (87.1)	Desconhecido	✓	✓	✓	✓		
67	18.3	477	MS ² [477]: 323 (100), 221 (22.4), 179 (25.6), 177 (15.0), 161 (14.0) MS ³ [477→323]: 275 (12.5), 263 (39.2), 221 (41.2), 203 (37.5), 179 (100), 179 (18.8), 177 (73.2), 135 (50.2)	Derivado do ácido cafeico					✓	
68	18.5	451	MS ² [451]: 341 (100) MS ³ [451→341]: 323 (11.7), 231 (25.0), 219 (29.2), 217 (100), 189 (17.5), 177 (19.3) MS ⁴ [451→341→217]: 191 (88.7), 189 (100), 153 (10.1)	Desconhecido					✓	✓
69	18.7	463	MS ² [463]: 337 (11.4), 323 (98.1), 221 (19.4), 179 (32.9), 135 (12.5) MS ³ [463→323]: 263 (100), 245 (17.3), 221 (46.1), 179 (97.8) MS ⁴ [463→323→179]: 135 (100)	Derivado do ácido cafeico					✓	✓

Tabela 13 (Continuação) - Caracterização por CLAE-ESI/EMⁿ dos fitoconstituintes dos extratos metanólicos de *Rubus grandifolius* (FX: Funchal; MX: Machico)

70	19.2	301	MS ² [301]: 257 (100), 229 (61.8), 217 (22.0), 185 (95.4), 146 (47.3), 119 (25.7)	Ácido elágico			✓		
71	19.2	463	MS ² [463]: 302 (13.8), 301 (100) MS ³ [463→301]: 273 (12.3), 271 (32.7), 257 (11.7), 255 (19.3), 179 (82.4), 151 (100)	Quercetina- <i>O</i> -hexosídeo			✓	✓	
72	19.8	483	MS ² [483]: 451 (17.1), 341 (23.6), 289 (100) MS ³ [483→289]: 245 (100), 205 (20.1), 203 (56.8), 187 (22.5), 179 (10.6)	Derivado de catequina- <i>O</i> -hexosídeo					✓
73	20.0	463	MS ² [463]: 323 (100), 301 (96.1) MS ³ [463→301]: 257 (100)	Ácido elágico- <i>O</i> -hexosídeo			✓	✓	✓
74	20.3	463	MS ² [463]: 301 (100) MS ³ [463→301]: 271 (12.2), 179 (83.8), 151 (100)	Quercetina- <i>O</i> -hexosídeo					✓
75	20.6	503	MS ² [503]: 471 (13.4), 341 (13.9), 329 (29.7), 323 (21.4), 179 (100), MS ³ [503→179]: 135 (100)	Ácido cafeico- <i>O</i> -dihexosídeo					✓
76	20.9	593	MS ² [593]: 285 (100), 255 (18.1) MS ³ [593→285]: 257 (100), 241 (40.5), 229 (53.4), 227 (22.9), 199 (22.8), 195 (35.6), 185 (17.0)	Caferol- <i>O</i> -rutinosídeo					✓
77	21.0	491	MS ² [491]: 323 (100), 179 (12.6) MS ³ [491→323]: 263 (30.2), 251 (22.2), 221 (84.5), 203 (43.1), 179 (100), 135 (94.9)	Derivado do ácido cafeico					✓
78	21.2	523	MS ² [523]: 476 (28.0), 475 (100) MS ³ [523→475]: 460 (14.3), 443 (24.2), 415 (14.5), 399 (10.1), 387 (11.2), 341 (34.0), 329 (100), 327 (25.2), 315 (43.3), 297 (10.7), 283 (38.7), 271 (15.6), 195 (18.9) MS ⁴ [523→475→329]: 315 (16.3), 314 (100), 298 (10.0), 296 (10.7), 282 (10.4), 164 (15.4), 149 (26.5)	Derivado de tricina- <i>O</i> -cumaroil					✓
79	22.1	711	MS ² [711]: 665 (11.9), 503 (100) MS ³ [711→503]: 439 (100), 427 (70.9), 409 (44.2), 368 (20.4) MS ⁴ [711→503→439]: 421 (31.1), 411 (47.2), 409 (100), 393 (25.0), 384 (75.0)	Ácido triterpeno- <i>O</i> -hexosídeo (aduto formado)					✓
80	22.9	461	MS ² [461]: 285 (100) MS ³ [461→285]: 267 (46.0), 255 (43.2), 217 (67.8), 213 (23.4), 199 (18.5), 175 (100), 129 (78.3)	Canferol- <i>O</i> -glicuronídeo					✓
81	23.0	477	MS ² [477]: 302 (15.7), 301 (100) MS ³ [477→301]: 229 (12.3), 179 (74.2), 151 (100)	Quercetina- <i>O</i> -glicuronídeo			✓	✓	✓
82	23.6	607	MS ² [607]: 505 (15.6), 464 (17.8), 463 (100) MS ³ [607→463]: 301 (100), 300 (372) 179 (90.5), 151 (30.0)	3-Hidroxi-3-metilglutaril-quercetina- <i>O</i> -hexosídeo			✓	✓	
83	24.0	593	MS ² [593]: 286 (13.4), 285 (100) MS ³ [593→285]: 267 (35.6), 257 (100), 255 (12.9), 241 (35.1), 229 (75.6), 223 (32.8), 213 (36.9), 197 (44.1), 195 (25.3), 167 (32.1), 163 (34.4), 151 (17.5)	Canferol- <i>O</i> -rutinosídeo					✓
84	24.1	503	MS ² [503]: 459 (28.0), 341 (14.5), 323 (100), 251 (10.5), 179 (52.2), 177 (10.6), 161 (15.1) MS ³ [503→179]: 135 (100)	Ácido cafeico- <i>O</i> -dihexosídeo					✓
85	24.5	433	MS ² [433]: 301 (100), 300 (90.7) MS ³ [433→301]: 271 (100), 257 (13.7), 255 (51.9), 179 (67.5), 151 (60.8)	Quercetina- <i>O</i> -pentosídeo			✓	✓	✓
86	24.8	515	MS ² [515]: 353 (100), 335 (13.7), 191 (11.1), 179 (22.0), 173 (40.1) MS ³ [515→353]: 191 (39.9), 179 (62.6), 173 (100), 135 (22.3)	Ácido 4,5- <i>O</i> -Dicafeoilquínico					✓
87	25.1	321	MS ² [321]: 303 (100), 259 (11.2), 215 (11.5) 179 (59.1), 159 (22.1), 135 (10.6) MS ³ [321→303]: 241 (56.9), 259 (100), 215 (25.1), 187 (10.0), 149 (11.7)	Desconhecido					✓
88	26.2	503	MS ² [503]: 341 (10.4), 323 (100), 221 (10.9), 179 (29.9) MS ³ [503→323]: 263 (20.4), 221 (34.4), 179 (100), 135 (29.9)	Ácido cafeico- <i>O</i> -dihexosídeo					✓
89	26.8	515	MS ² [515]: 353 (100) MS ³ [515→353]: 191 (100), 179 (44.7), 135 (12.5) MS ⁴ [515→353→191]: 173 (56.0), 127 (100), 111 (56.7), 85 (61.7)	Ácido 3,5- <i>O</i> -Dicafeoilquínico					✓
90	26.9	505	MS ² [505]: 463 (53.7), 301 (100)	Quercetina- <i>O</i> -(acetil)hexosídeo			✓	✓	

Tabela 13 (Continuação) - Caracterização por CLAE-ESI/EMⁿ dos fitoconstituintes dos extratos metanólicos de *Rubus grandifolius* (FX: Funchal; MX: Machico)

108	33.4	839	MS ² [839]: 677 (100), 503 (36.5) MS ³ [839→677]: 503 (100) MS ⁴ [839→677→503]: 485 (100), 453 (30.2), 441 (19.0), 428 (10.8), 409 (25.4), 403 (11.7)	Derivado do ácido triterpeno	✓				
109	33.7	547	MS ² [547]: 281 (32.0), 251 (27.6), 221 (12.6), 179 (59.7), 161 (100) MS ³ [547→179]: 135 (100)	Umbeliferona					✓
110	34.0	709	MS ² [709]: 501 (100) MS ³ [709→501]: 471 (11.9), 457 (60.5), 455 (14.2), 439 (30.3), 421 (100), 403 (72.8), 387 (11.2), 361 (13.9)	Desconhecido	✓	✓	✓	✓	
111	34.8	711	MS ² [711]: 665 (12.6), 503 (100), 501 (29.7) MS ³ [711→503]: 485 (100), 453 (18.3), 439 (15.4) MS ⁴ [711→503→485]: 453 (44.0), 439 (20.1), 421 (57.5), 419 (100), 403 (15.2), 385 (25.3)	Ácido triterpeno- <i>O</i> -hexosídeo (aduto formado)					✓ ✓
112	35.2	679	MS ² [679]: 519 (11.5), 517 (100) MS ³ [679→517]: 499 (100), 473 (20.0), 455 (10.8) MS ⁴ [679→517→499]: 455 (52.1), 441 (27.1), 419 (35.3), 403 (100), 379 (36.0)	Hexosídeo do ácido ganodérico C2	✓	✓	✓	✓	
113	35.7	517	MS ² [517]: 301 (100), 300 (25.8) MS ³ [517→301]: 283 (97.8), 257 (100)	Derivado do ácido elágico	✓				
114	35.9	593	MS ² [593]: 447 (11.4), 285 (100) MS ³ [593→285]: 257 (97.8), 255 (23.7), 241 (100), 229 (14.8), 213 (40.2)	Canferol- <i>O</i> -(cumaroil)hexosídeo	✓	✓	✓	✓	
115	36.2	301	MS ² [301]: 273 (15.0), 235 (10.8), 179 (40.4), 151 (100)	Quercetina	✓	✓			
116	37.3	695	MS ² [695]: 649 (10.4), 487 (100), 485 (12.4) MS ³ [695→487]: 467 (28.5), 425 (55.3), 423 (100), 391 (39.0) MS ³ [695→487]: 469 (100), 427 (33.7), 425 (40.7), 423 (17.0), 373 (16.5)	Desconhecido	✓	✓	✓	✓	
117	37.5	711	MS ² [711]: 503 (100) MS ³ [711→503]: 485 (100), 459 (13.0), 455 (18.2), 441 (53.2) MS ⁴ [711→503→485]: 455 (29.5), 440 (100), 423 (12.1)	Ácido triterpeno- <i>O</i> -hexosídeo (aduto formado)					✓ ✓
118	37.9	709	MS ² [709]: 501 (100) MS ³ [709→501]: 483 (11.3), 471 (100), 453 (32.3) MS ⁴ [709→501→471]: 453 (100), 428 (11.0), 423 (13.9), 325 (18.6)	Desconhecido					✓ ✓
119	38.5	663	MS ² [663]: 503 (12.4), 501 (100), 483 (56.9), 439 (15.8) MS ³ [663→501]: 483 (100), 465 (10.2), 457 (22.8), 455 (30.9) MS ⁴ [663→501→483]: 465 (100), 455 (22.0), 437 (22.6), 391 (87.2), 367 (65.7)	Hexosídeo do ácido ganolucídico B	✓	✓	✓	✓	
120	38.9	679	MS ² [679]: 633 (10.7), 517 (62.4), 499 (22.2), 471 (100) MS ³ [679→517]: 499 (100), 473 (72.6), 455 (15.1) MS ⁴ [679→517→499]: 455 (89.8), 442 (81.9), 437 (20.5), 425 (13.0), 397 (26.5), 395 (50.2), 393 (85.1), 381 (100)	Hexosídeo do ácido ganodérico C2	✓	✓	✓	✓	
121	39.9	163	MS ² [163]: 119 (100)	Ácido cumárico					✓
122	40.1	533	MS ² [533]: 485 (100), 471 (15.4) MS ³ [533→485]: 467 (100), 441 (83.8), 425 (22.3), 423 (30.2), 381 (31.2), 310 (14.0) MS ⁴ [533→485→441]: 423 (100), 379 (49.0)	Ácido 12-hidroxiganodérico C2					✓ ✓

†R = Tempo de retenção

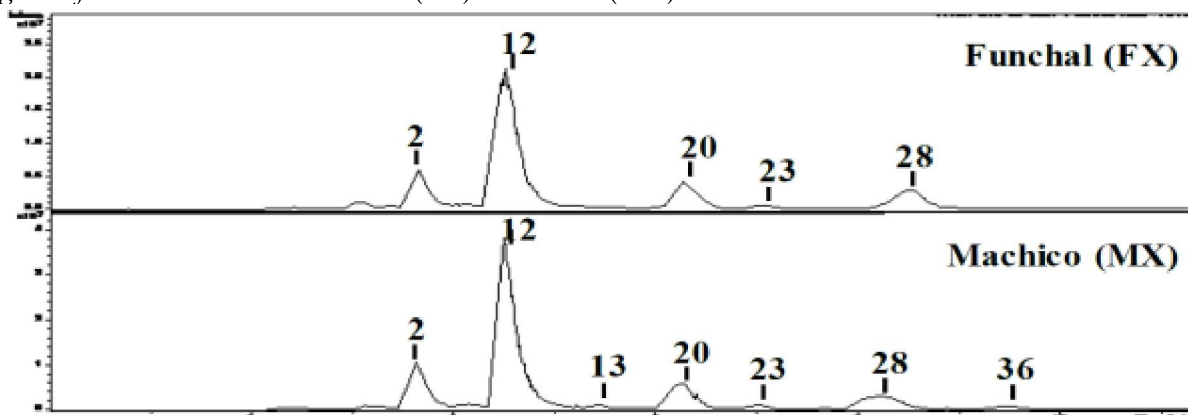
Fonte: Adaptado de Spínola (2018).

A análise e discussão do perfil fitoquímico de *R. grandifolius* coletado em dois locais diferentes da Ilha da Madeira (Funchal e Machico), descrito na Tabela 13, encontra-se reportado no estudo realizado por Spínola (2018) e foi utilizada em nossa investigação na relação entre composto e atividade antimicrobiana.

5.2.2 Perfis cromatográficos dos extratos metanólicos dos frutos de *Rubus grandifolius* no modo positivo de ionização

A Figura 22 representa os cromatogramas dos extratos metanólicos dos frutos de *R. grandifolius*, coletados em dois locais diferentes, analisados no modo positivo de ionização (ESI⁺). Esses dados foram utilizados para a identificação de antocianinas e para fins de confirmação. A detecção e a identificação dos picos estão apresentadas na Figura 22 e na Tabela 14, respectivamente.

Figura 22 - Cromatogramas obtidos por CLAE-ESI⁺/EMⁿ dos extratos metanólicos dos frutos de *Rubus grandifolius* coletados em Funchal (FX) e Machico (MX)



Fonte: Spínola (2018).

Tabela 14 - Caracterização por CLAE-ESI⁺/EMⁿ de antocianinas dos extratos metanólicos de frutos de *Rubus grandifolius* (FX: Funchal; MX: Machico)

N ^o	t _R (min)	[M-H] ⁺ (m/z)	CLAE-DAD-ESI/EM ⁿ m/z (% pico base)	Identificação atribuída	Frutos	
					FX	MX
2	3.6	449	MS ² [449]: 317 (17.4), 303 (61.9), 287 (100) MS ³ [449→287]: 241 (82.2), 213 (100), 175 (57.6), 161 (87.3), 153 (78.9)	Cianidina- <i>O</i> -hexosídeo	✓	✓
10	4.3	581	MS ² [581]: 449 (51.9), 287 (100) MS ³ [581→287]: 241 (82.2), 213 (100), 175 (57.6), 161 (87.3), 153 (78.9), 137 (24.6), 109 (19.2)	Cianidina- <i>O</i> -pentosil (hexosídeo)		✓
12	4.4	449	MS ² [449]: 317 (17.4), 303 (61.9), 287 (100) MS ³ [449→287]: 241 (82.2), 213 (100), 175 (57.6), 161 (87.3), 153 (78.9), 137 (24.6), 109 (19.2)	Cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	✓	✓
13	5.4	419	MS ² [419]: 317 (17.4), 303 (61.9), 287 (100) MS ³ [419→287]: 241 (82.2), 213 (100), 175 (57.6), 161 (87.3), 153 (78.9), 137 (24.6), 109 (19.2)	Cianidina- <i>O</i> -pentosídeo	✓	
17	6.2	449	MS ² [449]: 317 (17.4), 303 (61.9), 287 (100) MS ³ [449→287]: 241 (82.2), 213 (100), 175 (57.6), 161 (87.3), 153 (78.9), 137 (24.6), 109 (19.2)	Cianidina- <i>O</i> -hexosídeo	✓	✓
20	6.6	419	MS ² [419]: 317 (17.4), 303 (61.9), 287 (100) MS ³ [419→287]: 241 (82.2), 213 (100), 175 (57.6), 161 (87.3), 153 (78.9), 137 (24.6), 109 (19.2)	Cianidina- <i>O</i> -pentosídeo	✓	✓
23	7.5	449	MS ² [449]: 317 (17.4), 303 (61.9), 287 (100) MS ³ [449→287]: 241 (82.2), 213 (100), 175 (57.6), 161 (87.3), 153 (78.9), 137 (24.6), 109 (19.2)	Cianidina- <i>O</i> -hexosídeo	✓	✓
26	8.7	449	MS ² [449]: 317 (17.4), 303 (61.9), 287 (100) MS ³ [449→287]: 241 (82.2), 213 (100), 175 (57.6), 161 (87.3), 153 (78.9), 137 (24.6), 109 (19.2)	Cianidina- <i>O</i> -hexosídeo	✓	
28	8.9	535	MS ² [535]: 449 (51.3), 287 (100) MS ³ [535→287]: 257 (100), 213 (55.1), 175 (57.6), 161 (87.3), 153 (78.9), 137 (24.6), 109 (19.2)	Cianidina- <i>O</i> -(malonil) hexosídeo	✓	✓
30	9.1	593	MS ² [593]: 287 (100) MS ³ [593→287]: 257 (82.2), 213 (100), 175 (57.6), 161 (87.3), 153 (78.9), 137 (24.6), 109 (19.2)	Cianidina- <i>O</i> - dioxaloilglicosídeo	✓	✓
36	10.3	491	MS ² [491]: 449 (31.4), 287 (100) MS ³ [491→287]: 241 (82.2), 213 (100), 175 (57.6), 161 (87.3), 153 (78.9), 137 (24.6), 109 (19.2)	Cianidina- <i>O</i> -(acetil) hexosídeo		✓

Fonte: Adaptado de Spínola (2018).

Conforme demonstrado e discutido no item 5.1, o extrato metanólico de frutos de *R. grandifolius* apresentou-se como o extrato mais efetivo dentre todos os testados. Acreditamos que isso foi possível devido à grande diversidade de conteúdo fenólico presente nesse extrato. De fato, segundo Das e colaboradores (2017), acredita-se que o efeito antibacteriano de compostos fenólicos depende das estruturas da superfície celular das bactérias, substituintes no anel benzênico e o comprimento da cadeia lateral saturada dos ácidos fenólicos. Com relação às bactérias Gram-positivas, acredita-se que os compostos com atividade antibacteriana possam destruir a parede celular bacteriana e causar o vazamento e coagulação do seu conteúdo citoplasmático. Com relação às bactérias Gram-negativas, essas possuem uma superfície hidrofílica com a presença do lipopolissacarídeo como molécula base em sua membrana externa, o que impede a ação de substâncias hidrofóbicas externas, conferindo a essas bactérias uma maior resistência aos compostos antibacterianos (TIAN et al., 2018).

Há estudos demonstrando a atividade antibacteriana dos compostos que estão presentes no extrato de frutos de *R. grandifolius*. Rauha e colaboradores (2000) realizaram uma triagem antimicrobiana de 13 compostos fenólicos (substâncias puras) e 29 extratos vegetais, frente a nove espécies microbianas (*Aspergillus niger*, *B. subtilis*, *Candida albicans*, *E. coli*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. aureus* e *S. epidermidis*). Um dos compostos fenólicos avaliados neste estudo e que apresentou os melhores resultados foi a quercetina, presente nos extratos de frutos investigados no nosso estudo (Composto 115), apresentando atividade principalmente contra bactérias Gram-positivas (moderada à forte) e menor atividade contra bactérias Gram-negativas (ligeira à moderada). Autores descrevem que a quercetina pode atuar essencialmente pela inibição enzimática da DNA girase (BORRÁS-LINARES et al., 2015; CUSHNIE; LAMB, 2005), mecanismo de ação utilizado pelas quinolonas.

Naz e colaboradores (2007) investigaram o potencial antibiótico de alguns compostos fenólicos, dentre eles, a quercetina e a cianidina-3-*O*-glicosídeo, que também estão presentes nos frutos dos extratos investigados neste estudo (Compostos 115 e 12, respectivamente). Os compostos exibiram atividade substancial contra espécies de corinebactérias, estafilococos e estreptococos, *B. subtilis*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, entre outras. No entanto, esses compostos foram mais ativos contra espécies Gram-positivas do que frente as Gram-negativas.

Alves e colaboradores (2013) investigaram a atividade antimicrobiana através da determinação da CIM de diferentes compostos fenólicos presentes em espécies de cogumelos silvestres, dentre eles o ácido elágico, quercetina e ácido cumárico (Compostos 70, 115 e 121 detectados em nosso estudo, respectivamente), frente à cepas isoladas de pacientes doentes

internados em hospitais do município de Chaves, Portugal, à saber: seis bactérias Gram-positivas [*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), isoladas de exsudatos de feridas, *S. epidermidis*, *E. faecalis* e *L. monocytogenes* isolados de hemocultura e *Streptococcus agalactiae* isolado de swab vaginal] e cinco bactérias Gram-negativas (*E. coli* resistente à levofloxacina, ciprofloxacina e ampicilina e intermediária à amoxicilina/ácido clavulânico, *Proteus mirabilis* e *Morganella morganii*, isoladas da urina, *Pasteurella multocida* isoladas do líquido sinovial e *Neisseria gonorrhoeae* isolada do exsudato uretral). Estes compostos demonstraram ser ativos frente à algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, dentre elas uma cepa de *E. coli*, *Pasteurella multocida*, MRSA e *L. monocytogenes*, com CIM variando de 500 a 1000 µg/mL.

A análise do conteúdo fenólico presente no extrato de frutos de *R. grandifolius* nos faz acreditar que a atividade antibacteriana observada em nosso estudo se deva pela ação conjunta de diversos compostos fenólicos e não por apenas um composto isolado.

6 CONCLUSÕES

Somados, os resultados obtidos permitem concluir que:

- Dos vinte extratos metanólicos de diferentes partes de espécies vegetais procedentes da Ilha da Madeira e Açores, Portugal, onze mostraram-se ativos frente a pelo menos uma das cepas bacterianas testadas;
- Entre as onze amostras que se mostraram ativas, o extrato metanólico de *R. grandifolius* foi o mais efetivo, juntamente com *S. lanceolata*, sendo ativo frente a todas as cepas testadas e efeito bactericida sobre as três cepas de *P. aeruginosa*, inclusive a clínica humana;
- A atividade antibacteriana observada para o extrato de frutos de *R. grandifolius* se deve, provavelmente, pela ação combinada dos diversos compostos fenólicos presentes no extrato;
- A atividade antibacteriana de *R. grandifolius* é considerada fraca segundo Kuete (2010); o que não impede de especularmos o potencial antibacteriano dessa planta que é amplamente utilizada no tratamento de processos infecciosos;
- A caracterização química dos extratos metanólicos das folhas e frutos de *R. grandifolius* demonstrou a presença de diversas classes de metabólitos secundários, em especial os compostos fenólicos (antocianinas, outros flavonoides, ácidos fenólicos, terpenoides, cumarinas e ácidos orgânicos).

REFERÊNCIAS

ADEOLU, M.; ALNAJAR, S.; NAUSHAD, S.; GUPTA, R. S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the '*Enterobacteriales*': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Peptobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov.; and *Budviciaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 5575-5599, 2016.

AIDARA-KANE, A.; ÂNGULO, F. J.; CONLY, J. M.; MINATO, Y.; SILBERGELD, E. K.; MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. World Health Organization (WHO) guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, p. 1-8, 2018.

ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 697-705, 2005.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, M. A.; CEREZO, A. B.; CAÑETE, A.; TRONCOSO, A. M.; PARRILLA, M. C. G. Composition of non-anthocyanin polyphenols in alcoholic-fermented strawberry products, using LC-MS (QTRAP), high-resolution mass spectrometry (UHPLC-Orbitrap-MS), LC-DAD and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 2041-2051, 2015.

ALVES, M. J.; FERREIRA, I. C. F. R.; FROUFE, H. J. C.; ABREU, R. M. V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p. 346-357, 2013.

AL-ISHAQ, R. K.; ABOTALEB, M.; KUBATKA, P.; KAJO, K.; BÜSSELBERG, D. Flavonoids and their anti-diabetic effects: cellular mechanisms and effects to improve blood sugar levels. **Biomolecules**, v. 9, p. 1-35, 2019.

AMINOV, R. History of antimicrobial drug discovery: major classes and health impact. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 4-19, 2017.

ANAND, U.; JACOBO-HERRERA, N.; ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. **Metabolites**, v. 9, p. 258, 2019.

ANCILLOTTI, M.; ERIKSSON, S.; VELDWIJK, J.; FAHLQUIST, J. N.; ANDERSSON, D. I.; GODSKESEN, T. Public awareness and individual responsibility needed for judicious use of antibiotics: a qualitative study of public beliefs and perceptions. **BMC Public Health**, v. 18, p. 1153, 2018.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5-16, 2001.

BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P. AZIZI, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 12, p. 1-9, 2013.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BARTON, M. The Story of Penicillin. **Past Medical History**, 2017. Disponível em: <<https://www.pastmedicalhistory.co.uk/the-story-of-penicillin/>>. Acesso em: 30 mar. 2019.

BAVISKAR, A. S.; KHATIB, K. I.; RAJPAL, D.; DONGARE, H. C. Nosocomial infections in surgical intensive care unit: a retrospective single-center study. **International Journal of Critical Illness and Injury Science**, v. 9, p. 16-20, 2019.

BORRÁS-LINARES, I.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; ARRÁEZ-ROMAN, D.; PALMEROS-SUÁREZ, P. A.; VAL-DÍAZ, R. D.; ANDRADE-GONZÁLES, I.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; GÓMEZ-LEYVA, J. F.; SEGURA-CARRETERO, A. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*), **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 385-394, 2015.

BOUZA, E.; ALONSO, S.; ASENSIO, A.; de JUAN, G.; GARCIA LUCIO, C.; LARROSA, C.; LÓPEZ-IGLESIAS, J.; MUÑOZ, P.; SIERRA, R.; PERIANES, J.; de LA SERNA, J. L.; PALOMO, E.; GRACIA, D. Information on nosocomial infections in the mainstream media: an opinion document. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 32, p. 165-177, 2019.

BRAGA, M. C. **Histórico da utilização de plantas medicinais**. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso do Curso de Licenciatura em Biologia à Distância) - Consórcio Setentrional de Educação à Distância, Universidade de Brasília, Universidade Estadual de Goiás, Brasília, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 17: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência Microbiana no ano de 2017**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017. 6 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. 381 p.

BRESCIANI, L.; CALANI, L.; COSSU, M.; MENA, P.; SAYEGH, M.; RAY, S.; DEL RIO, D. (Poly)phenolic characterization of three food supplements containing 36 different fruits, vegetables and berries. **PharmaNutrition**, v. 3, p. 11-19, 2015.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v. 529, p. 336-343, 2016.

BUER, C. S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. Flavonoids: new roles for old molecules. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, p. 98-111, 2010.

BUJOR, O. C.; LE BOURVELLEC, C.; VOLF, I.; POPA, V. I.; DUFOUR, C. Seasonal variations of the phenolic constituents in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves, stems and fruits, and their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 213, p. 58-68, 2016.

CASSINI, A.; PLACHOURAS, D.; ECKMANN, T.; ABU SIN, M.; BLANK, H.-P.; DUCOMBLE, T.; HALLER, S.; HARDER, T.; KLINGEBERG, A.; SIXTENSSON, M.; VELASCO, E.; WEIÛ, B.; KRAMARZ, P.; MONNET, D. L.; KRETZSCHMAR, M. E.; SUETENS, C. Burden of six healthcare-associated infections on European population health: estimating incidence-based disability-adjusted life years through a population prevalence-based modelling study. **PLoS Medicine**, v. 13, p. e1002150, 2016.

CEDAS, V., SOTO, S. M. Relationship between virulence and resistance among Gram-negative bacteria. **Antibiotics**, 2020, v. 9, p. 719.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013**. Atlanta, 2013, 113p.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **United States Life Tables, 2017**. 2019. Disponível em: https://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr68/nvsr68_07-508.pdf

ČETOJEVIĆ-SIMIN, D. D.; RANITOVIĆ, A. S.; CVETKOVIĆ, D. D.; MARKOV, S. L.; VINČIĆ, M. N.; DJILAS, S. M. Bioactivity of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) pomace: polyphenol content, radical scavenging, antimicrobial and antitumor activity. **Acta Periodica Technologica**, v. 48, p. 63-76, 2017.

CHEN, L.; XIN, X.; YUAN, Q.; SU, D.; LIU, W. Phytochemical properties and antioxidant capacities of various colored berries. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 180-188, 2014.

CHO, M. J.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L.; CLARK, J. R. Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 2149-2158, 2005.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3821-3832, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition**. CLSI document M07-A10. Wayne, PA, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 30th ed**. CLSI supplement M100-S30. Wayne, PA, 2020.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DAI, J.; PATEL, J. D.; MUMPER, R. J. Characterization of blackberry extract and its antiproliferative and anti-inflammatory properties. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 258-265, 2007.

DAS, Q.; ISLAM, M. R.; MARCONE, M. F.; WARRINER, K.; DIARRA, M. S. Potential of berry extracts to control foodborne pathogens. **Food Control**, v. 73, p. 650-662, 2017.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 3th ed. London: John Wiley, 2009.

DIAS, M. I.; SOUSA, M. J.; ALVES, R. C.; FERREIRA, I. C. F. R. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: a review. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 9-22, 2016.

DUDZINSKA, D.; BEDNARSKA, K.; BONCLER, M.; LUZAK, B.; WATALA, C. The influence of *Rubus idaeus* and *Rubus caesius* leaf extracts on platelet aggregation in whole blood. Cross-talk of platelets and neutrophils. **Platelets**, v. 27, p. 433-439, 2016.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

EDDINE, L. S.; REDHA, O. M.; LADJEL, O. M. Influence of solvent extraction on phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory activities of aerial parts extract from Algerian *Artemisia Herba-alba*. **Journal of Pharmacy Research**, v. 10, p. 58-64, 2016.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development - the failure of success? **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1497-1503, 2006.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB209>>. Acesso em 24 Jun. 2019.

FRID-NIELSEN, S. S.; RUBIN, O.; BAEKKESKOV, E. The state of social science research on antimicrobial resistance. **Social Science & Medicine**, v. 242, p. 1-5, 2019.

FURUSE, Y. Analysis of research intensity on infectious disease by disease burden reveals which infectious diseases are neglected by researchers. **PNAS**, v. 116, p. 478-483, 2019.

GOBBO-NETO, I.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GOLOVINSKAIA O; WANG C-K. Review of functional and pharmacological activities of berries. **Molecules**, v. 26, p. 3904, 2021.

GOUVEIA-FIGUEIRA, S. C.; CASTILHO, P. C. Phenolic screening by HPLC–DAD–ESI/MSⁿ and antioxidant capacity of leaves, flowers and berries of *Rubus grandifolius* Lowe. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 28-40, 2015.

GROCHOWSKI, D. M.; PADUCH, R.; WIATER, A.; DUDEK, A.; PLESZCZYŃSKA, M.; TOMCZYKOWA, M.; GRANICA, S.; POLAK, P.; TOMCZYK, M. *In vitro* antiproliferative and antioxidant effects of extracts from *Rubus caesius* leaves and their quality evaluation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, Article ID 5698685, 2016.

HAO, D. C.; GU, X.-J.; XIAO, P. G. *Potentilla* and *Rubus* medicinal plants. **Medicinal Plants**, v. 10, p. 373-430, 2015.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, p. 111-129, 2015.

HERNANDO-AMADO, S.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. **Nature Microbiology**, v. 4, p. 1432-1442, 2019.

HIDALGO, G-I.; ALMAJANO, M. P. Red fruits: extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: a review. **Antioxidants**, v. 6, p. 1-27, 2017.

HUMMER, K. E. *Rubus* pharmacology: antiquity to the present. **Hortscience**, v. 45, p. 1587-1591, 2010.

HUMMER, K. E.; JANICK, J. Rosaceae: taxonomy, economic importance, genomics. In: FOLTA, K. M.; GARDINER, S. E. (eds.) *Genetics and Genomics of Rosaceae*. New York: Springer, 2009. p.1-17

JAISSWAL, R.; JAYASINGHE, L.; KUHNERT, N. Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the *Rhododendron* genus (Ericaceae) by tandem LC-MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, p. 502-515, 2012.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 155-176, 2016.

KHAN, H. A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, p. 478-482, 2017.

KOULENTI, D.; SONG, A.; ELLINGBOE, A.; ABDUL-AZIZ, M.; HARRIS, P.; GAVEY, E. LIPMAN, J. Infections by multidrug-resistant Gram-negative bacteria: what's new in our arsenal and what's in the pipeline? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, p. 211-224, 2019.

KRZEPIŁKO A; PRAŽAK R; ŚWIĘCIŁO A. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of raspberry, blackberry and raspberry-blackberry hybrid leaf buds. **Molecules**, v. 26, p. 327, 2021.

KUETE, V. Potential of Cameroonian plant and derived products against microbial infections: a review. **Planta Medica**, v. 76, p. 1479-1491, 2010.

KUMAR, N.; GOEL, N. Phenolic acids: natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, v. 24, p. 1-10, 2019.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-16, 2013.

LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature Reviews Discovery**, v. 12, p. 371-387, 2013.

LIVERMORE, D. M.; NICOLAU, D. P.; HOPKINS, K. L.; DANIELE MEUNIER. Carbapenem-resistant Enterobacterales, carbapenem resistant organisms, carbapenemase-producing Enterobacterales, and carbapenemase-producing organisms: terminology past its "Sell-By Date" in an era of new antibiotics and regional carbapenemase epidemiology. **Clinical Infectious Disease**, v. 71, p. 1776-1782, 2020.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; SPÍNOLA, V.; CASTILHO, P. C. Evaluation of the inorganic content of six underused wild berries from Portugal: potential new sources of essential minerals. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 59, p. 153-160, 2017.

LO, E. Y. Y.; DONOGHUE, M. J. Expanded phylogenetic and dating analyses of the apples and their relatives (Pyreae, Rosaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 63, p. 230-243, 2012.

LOBANOVSKA, M; PILLA, G. Penicillin's discovery and antibiotic resistance: lessons for the future? **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, p. 135-145, 2017.

LONGHI, S.; GIONGO, L.; BUTI, M.; SURBANOVSKI, N.; VIOLA, R.; VELASCO, R.; AWARD, J.; SARGENT, D. J. Molecular genetics and genomics of the Rosoideae: state of the art and future perspectives. **Horticulture Research**, v. 1, p. 1-18, 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. *Microbiologia de Brock*. 14^a ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MAHADY, G. B. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, p. 2405-2427, 2005.

MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 299, p. 1-11, 2019.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 365-373, 2011.

MENA, P.; CALANI, L.; DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; GARCIA-VIGUERA, C.; BRUNI, R.; CROZIER, U.; DEL RIO, D. Rapid and comprehensive evaluation of (poly)phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by UHPLC-MSⁿ. **Molecules**, v. 17, p. 14821-14840, 2012.

MENDES, V. A.; STOCCO, P.; LARA, A. C.; OLIVEIRA, C. M.; LISBOA, H. C. F. Avaliação do uso de produtos naturais na prática do profissional de saúde. **Saúde (Santa Maria)**, v. 44, p. 1-7, 2018.

MIKULIC-PETKOVSEK, M.; SLATNAR, A.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R. HPLC-MSⁿ identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2138-2146, 2012.

MOHR, K. I. History of Antibiotics Research. **How to Overcome the Antibiotic Crisis. Current Topics in Microbiology and Immunology**. 1st ed. Springer, Cham, 2016. p. 237-272.

NAZ, S.; SIDDIQI, R.; AHMAD, S.; RASOOL, S. A.; SAYEED, S. A. Antibacterial Activity Directed Isolation of Compounds from *Punica granatum*. **Journal of food Science**, v. 72, p. 341-345, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, p. 770-803, 2020.

NIEUWLAAT, R.; MBUAGBAW, L.; MERTZ, D.; BURROWS, L. L.; BOWDISH, D. M. E.; MOJA, L.; WRIGHT, G. D.; SCHÜNEMANN, H. J. COVID-2019 and antimicrobial resistance: parallel and interacting health emergencies. **Clinical Infectious Diseases**, ciae773, p. 1-3, 2020.

NIKITINA, V. S.; KUZ'MINA, L. Y.; MELENT'EV, A. I.; SHENDEL', G. V. Antibacterial activity of polyphenolic compounds isolated from plants of Geraniaceae and Rosaceae families. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, p. 707-714, 2007.

O'NEILL, J. **The Review on Antimicrobial Resistance. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations**. London: HM Government and Wellcome^{trust}, 2016.

OSZMIAŃSKI, J.; WOJDYŁO, A.; NOWICKA, P.; TELESZKO, M.; CEBULAK, T.; WOLANIN, M. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in leaves from wild *Rubus* L. Species. **Molecules**, v. 20, p. 4951-4966, 2015.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. 1-15, 2016.

PARKAR SG; REDGATE EL; MCGHIE TK; HURST RD. *In vitro* studies of modulation of pathogenic and probiotic bacterial proliferation and adhesion to intestinal cells by blackcurrant juices. **Journal of Functional Foods 8C**, v. 2014, p. 35-44, 2014.

PINTO, J. C. N. **Estudo da Composição e das Propriedades Bioativas de Plantas Produtoras de Bagas**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) - Centro de Química da Madeira, Universidade da Madeira, Funchal, Madeira - Portugal, 2016.

POTTER, D.; GAO, F.; BORTIRI, P. E., OH, S.-H.; BAGGETT, S. Phylogenetic relationships in Rosaceae inferred from chloroplast *matK* and *trnL-trnF* nucleotide sequence data. **Plant Systematics and Evolution**, v. 231, p. 77-89, 2002.

POTTER, D.; ERIKSSON, T.; EVANS, R. C.; OH, S.; SMEDMARK, J. E. E.; MORGAN, D. R.; KERR, M.; ROBERTSON, K. R.; ARSENAULT, M.; DICKINSON, T. A.; CAMPBELL, C. S. Phylogeny and classification of Rosaceae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 266, p. 5-43, 2007.

PUBCHEM COMPOUND, 2019. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 12 jun. 2019.

RAINA, S. K.; GALWANKAR, S.; DHARIWAL, A. C.; BHATT, R.; KUMAR, R.; GILADA, I.; AGGARWAL, P.; KRISHNAN, S. V.; SOANS, S.; SRIVASTVA, R. P.; BODHANKAR, U. Fighting antimicrobial resistance: status paper with action points by organized medicine academic guild. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 11, p. 54-58, 2019.

RAJENDRAN NK; GEORGE BP; HOURELD NN; ABRAHAMSE. Synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Rubus fairholmianus* root extract and their activity against pathogenic bacteria. **Molecules**, v. 26, p. 3029, 2021.

RAMBARAN, T. F.; NEMBHARD, N.; BOWEN-FORBES, C. S.; ALEXANDER-LINDO, R. L. Hypoglycemic effect of the fruit extracts of two varieties of *Rubus rosifolius*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, p. e13365, 2020.

RAUHA, J.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds, **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 3-12, 2000.

RELLO, J.; PARISELLA, F. R.; PEREZ, A. Alternatives to antibiotics in an era of difficult-to-treat resistance: new insights. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 12, p. 635-642, 2019.

RIVERA, D.; OBON, C. The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo islands, a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 73-93, 1995.

ROCABADO, G. O.; BEDOYA, L. M.; ABAD, M. J.; BERMEIO, P. *Rubus* - A review of its phytochemical and pharmacological profile. **Natural Product Communications**, v. 3, p. 423-436, 2008.

SCHÄDLER, V.; DERGATSCHewa, S. *Rubus caesius* L. leaves: pharmacognostic analysis and the study of hypoglycemic activity. **National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, p. 501-508, 2017.

SCHANZENBACH, D. W.; NUNN, R.; BAUER, L. The Changing Landscape of American Life Expectancy. **The Hamilton Project**, 2016. Disponível em: <https://www.hamiltonproject.org/assets/files/changing_landscape_american_life_expectancy.pdf>. Acesso em: 29 de set. de 2021.

SEERAM NP. Emerging research supporting the positive effects of berries on human health and disease prevention. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5685-5686, 2012.

SEJALI, S. N. F.; ANUAR, M. S. Effect of drying methods on phenolic contents of neem (*Azadirachta indica*) leaf powder. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 17, p. 119-131, 2011.

SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 71-109, 2011.

SIMIRGIOTIS, M. J.; SILVA, M.; BECERRA, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Direct characterisation of phenolic antioxidants in infusions from four Mapuche medicinal plants by liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). **Food Chemistry**, v. 131, p. 318-327, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS, 2007.

SOUNDARARAJAN, P.; WON, S. Y.; KIM, J. S. Insight on Rosaceae family with genome sequencing and functional genomics perspective. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 7519687, 2019.

SPÍNOLA, V. A. R. **Nutraceuticals and Functional Foods for Diabetes and Obesity Control**. Tese (Doutorado em Química Especializada em Bioquímica) - Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais do Centro de Química da Madeira (CQM), Universidade da Madeira, Funchal, Madeira - Portugal, 2018.

SPÍNOLA, V.; LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; GOUVEIA, S.; CASTILHO, P. C. *Myrica faya*: a new source of antioxidante phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 9722-9735, 2014.

SPÍNOLA, V.; PINTO, J.; CASTILHO, P. C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSⁿ and screening for their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 173, p. 14-30, 2015.

SPÍNOLA, V.; PINTO, J.; LLORENT-MARTINEZ, E. J.; TOMÁS, H.; CASTILHO, P. C. Evaluation of *Rubus grandifolius* L. (wild blackberries) activities targeting management of type-2 diabetes and obesity using *in vitro* models. **Food and Chemical Toxicology**, v. 123, p. 443-452, 2019.

SULTANA, N. Plants of genus *Rubus* as a source of pharmaceuticals. **Cient Periodique Nutrition**, v. 3, p. 1-71, 2018.

SUN, Y.; GUO, J.; LI, Y.; LUO, G.; LI, L.; YUAN, H.; MUR, L. A. J.; GUO, S. Negative effects of the simulated nitrogen deposition on plant phenolic metabolism: a meta-analysis. **Science of the Total Environment**, v. 719, p. 1-9, 2020.

TANDON, A.; SRIVASTAVA, A.; JAISWAL, R.; SINGH, P. Bacterial diseases: humans vs microorganisms. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, p. 231-243, 2017.

TAS, F.; USTUNER, Z.; CAN, G.; ERALP, Y.; CAMLICA, H.; BASARAN, M.; KARAGOL, H.; SAKAR, B.; DISCI, R.; TOPUZ, E. The prevalence and determinants of the use of complementary and alternative medicine in adult Turkish cancer patients. **Acta Oncologica**, v. 44, p. 161-167, 2005.

TEMPONI, V. S.; SILVA, J. B.; ALVES, M. S.; RIBEIRO, A.; PINHO, J. J. R. G.; YAMAMOTO, C. H.; PINTO, M. A. O. P.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O. V. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Vernonia polyanthes* leaves in rodents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 3887-3899, 2012.

THE PLANT LIST (2019a). Rosaceae Family. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Rosaceae/>> Acesso em 20 set. 2019.

THEURETZBACHER, U. Antibiotic innovation for future public health needs. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, p. 713-717, 2017.

THEURETZBACHER, U.; BUSH, K.; HARBARTH, S.; PAUL, M.; REX, J. H.; TACCONELLI, E.; THWAITES, G. E. Critical analysis of antibacterial agents in clinical development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, p. 286-298, 2020.

THIEM, B.; GOŚLIŃSKA, O. Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves. **Fitoterapia**, v. 75, p. 93-95, 2004.

TIAN, Y.; PUGANEN, A.; ALAKOMI, H.; UUSITUPA, A.; SAARELA, M.; YANG, B. Antioxidative and antibacterial activities of aqueous ethanol extracts of berries, leaves, and branches of berry plants. **Food Research International**, v. 106, p. 291-303, 2018.

TOHMA, H.; KÖKSAL, E.; KILIÇ, O.; ALAN, Y.; YILMAZ, M. A.; GÜLÇİN, I.; BURSAL, E.; ALWASEL, S. H. RP-HPLC/MS/MS Analysis of the phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia* L. species. **Antioxidants**, v. 5, p. 1-15, 2016.

TRÓPICOS, 2019. Disponível em: <<https://www.tropicos.org/Name/42000176?tab=maps#>>. Acesso em 24 jun. 2019.

VAN DUIJKEREN, E.; SCHINK, A.; ROBERTS, M. C.; WANG, Y.; SCHWARZ, S. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **Microbiology Spectrum**, v. 6, p. 1-31, 2018.

WELI, A. M.; AL-SAAD, H. S.; AL-FUDHAILI, R. S.; HOSSAIN, A.; PUTIT, Z. B.; JASIM, M. K. Cytotoxic and antimicrobial potential of different leaves extracts of *R. fruticosus* used traditionally to treat diabetes. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 183-87, 2020.

WON, J. Y.; SON, S. Y.; LEE, S.; SINGH, D.; LEE, S.; LEE, J. S.; LEE, C. H. Strategy for screening of antioxidant compounds from two Ulmaceae species based on liquid chromatography-mass spectrometry. **Molecules**, v. 23, p. 1-15, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis**. Geneva: WHO, 2017a. 48 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antibiotic resistance**. 2017b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>>. Acesso em: 18 set. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), **Antimicrobial resistance**. 2020. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#:~:text=Antimicrobial%20Resistance%20\(AMR\)%20occurs%20when,spread%2C%20severe%20illness%20and%20death](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#:~:text=Antimicrobial%20Resistance%20(AMR)%20occurs%20when,spread%2C%20severe%20illness%20and%20death)>. Acesso em 29 abr. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis.** Geneva: WHO, 2017c. 48 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report on the burden of endemic healthcare-associated infection worldwide. A systematic review of the literature.** Geneva: WHO, 2011. 40 p.

YI, Q. S.; WAN, Z. Z. A.; NURULHIDAYAH, C. N.; MOHAMAD, E. Y.; AZLINA, A.; SUHARNI, M. The antibacterial properties of *Euphorbia tirucalli* stem extracts against dental caries-related bacteria. **Medicine & Health**, v. 12, p. 34-41, 2017.

YOSHIMURA, Y.; ZAIMA, N.; MORIYAMA, T.; KAWAMURA, Y. Different localization patterns of anthocyanin species in the pericarp of black rice revealed by imaging mass spectrometry. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-9, 2012.

ZAKERI, B.; LU, T. K. Synthetic biology of antimicrobial discovery. **ACS Synthetic Biology**, v. 2, p. 358-372, 2013.

ZAMAN, S. B.; HUSSAIN, M. A.; NYE, R.; MEHTA, V.; MAMUN, K. T.; HOSSAIN, N. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. **Cureus**, v. 9, p. 1-9, 2017.

ZAREI, A.; ERFANI-MOGHADAM, J.; MOZAFFARI, M. Phylogenetic analysis among some pome fruit trees of Rosaceae family using RAPD markers. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 31, p. 289-298, 2017.

ZHONG, Y.; YIN, H.; SARGENT, D. J.; MALNOY, M.; CHENG, Z. Species-specific duplications driving the recent expansion of NBS-LRR genes in five Rosaceae species. **BMC Genomics**, v. 16, p. 1-16, 2015.

ZIKORA, A.; ZAHRA, F. Nosocomial Infections. *In*: StatPearls [Internet]. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559312/>. Acesso em 24 abr. 2021.

ZORRILLA-FONTANESI, Y.; CABEZA, A.; TORRES, A. M.; BOTELLA, M. A.; VALPUESTA, V.; MONFORT, A.; SÁNCHEZ-SEVILLA, J. F.; AMAYA, I. Development and bin mapping of strawberry genic-SSRs in diploid *Fragaria* and their transferability across the Rosoideae subfamily. **Molecular Breeding**, v. 27, p. 137-156, 2011.

ANEXO A – Artigo publicado intitulado “Synthesis of arylfuran derivatives as potential antibacterial agents”

Medicinal Chemistry Research (2021) 30:1074–1086
<https://doi.org/10.1007/s00044-021-02711-y>

MEDICINAL
CHEMISTRY
RESEARCH

ORIGINAL RESEARCH



Synthesis of arylfuran derivatives as potential antibacterial agents

Marina M. S. Andrade¹ · Ícaro F. Protti¹ · Vinicius G. Maltarollo¹ · Ygor F. G. da Costa² · Wesley G. de Moraes² · Nicole F. Moreira² · Giovana G. Garcia² · Gabriel F. Caran³ · Flaviano M. Ottoni¹ · Ricardo J. Alves¹ · Carolina P. S. Moreira⁴ · Helen R. Martins³ · Maria Silvana Alves² · Renata B. de Oliveira¹

Received: 8 September 2020 / Accepted: 30 January 2021 / Published online: 17 February 2021
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC part of Springer Nature 2021

Abstract

Bacterial infections represent a serious health care problem mainly due to the misuse and overuse of antibiotics, with consequent emergence of multidrug resistant bacterial strains. Then, because the urgent need to find novel and alternative antibacterial agents, the present work focuses on the synthesis of arylfuran derivatives with potential antimicrobial activity. Eighteen arylfuran derivatives were synthesized and evaluated for their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Among them, seven compounds containing an amino group in their structure showed activity, with compound **24** being the most effective against both Gram-negative (*E. coli*, MIC = 49 µM) and Gram-positive (*S. aureus*, MIC = 98 µM) bacteria, besides having exhibited a modest activity against *P. aeruginosa* (MIC = 770 µM). In addition, based on in silico studies, this is a druglike compound since it does not violate any rules for predicting oral bioavailability. In this context, the significant antibacterial potential and the low similarity with known antibiotics indicate the innovative aspect of compound **24**.

Keywords Arylfuran derivatives · Antibacterial agents · Oral bioavailability · Innovative compound

Introduction

Bacteria are present everywhere and can cause a variety of infections that, if untreated, it can develop into much more serious consequences [1–3]. Currently, the increasing

emergence of multidrug resistant (MDR) bacteria limits the effectiveness of therapeutic options, representing a serious public health problem [4–6].

Based on this the World Health Organization (WHO) declared the antimicrobial resistance (AMR), mainly the antibiotic (antibacterial) resistance (AR), as a major global public health problem of the 21st century, and requested the intervention of the scientific community to the research, discovery, and development of new innovative antibiotics [7]. In fact, although there has been an increase in the number of the FDA approved antibacterial agents in 2018–2019, the number and efficacy of these new drugs is far from sufficient [8].

As example of this worrying scenario related to the incidence of infections caused by MDR pathogens, it can mention the quinolones and fluoroquinolones whose use and rate of resistance have been increasing around the world [9], and the significant toxicity (nephrotoxicity) of the polymyxin B and colistin, considered the last-line options for the treatment of infections caused by MDR Gram-negative bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* [10]. Therefore, it is urgent and necessary that new approaches to treat bacterial infections are found.

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02711-y>.

✉ Renata B. de Oliveira
 renatabo.ufmg@gmail.com

¹ Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

² Laboratório de Biotividade Celular e Molecular, Centro de Pesquisas Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, MG, Brazil

³ Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina, MG, Brazil

⁴ Serviço de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, MG, Brazil

ANEXO B – Artigo publicado intitulado “Ambiente marinho e resistência bacteriana aos antimicrobianos: impacto à saúde humana”

Acta Scientiae et Technicae, Vol 7, number 2, 2019.

ISSN 2317-8957



Ambiente marinho e resistência bacteriana aos antimicrobianos: impacto à saúde humana

Ingrid Cristine Guimarães Pereira¹, Ygor Ferreira Garcia da Costa², Wesley Gonçalves de Moraes², Marinella Silva Laport³, Maria Silvana Alves², Flávia Lúcia Piffano Costa Pellegrino¹

AUTHOR AFFILIATIONS

- 1 – Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste
- 2 – Universidade Federal de Juiz de Fora
- 3 – Universidade Federal do Rio de Janeiro

CONTACT

flpellegrino@hotmail.com

ABSTRACT

The marine environment has been receiving attention from scholars in the field of bacterial resistance to antimicrobials over the last few decades, mainly due to the presence, in this environment, of a great diversity of bacterial species carrying genetic elements involved with resistance and of free genes that encode mechanisms of resistance. On the other hand, studies point to the sea as a promising source of new compounds with antibiotic effect, many of them active against pathogenic bacteria. These studies have collaborated in understanding the origin and dynamics of antimicrobial resistance in bacterial communities in their natural habitat. Thus, the present work consists of a current and relevant review of the literature with regard to the importance of the marine environment and its relationship with bacterial resistance to antimicrobials, and addresses general aspects of this phenomenon, the main marine bacterial species carrying resistance genes and the impact of this relationship on human health.

Keywords: Marine environment; Antimicrobial resistant bacteria; Resistance genes; Public health.

RESUMO

O ambiente marinho vem recebendo atenção de estudiosos da área de resistência bacteriana aos antimicrobianos ao longo das últimas décadas, principalmente devido à presença, nesse ambiente, de grande diversidade de espécies bacterianas carregando elementos genéticos envolvidos com a resistência e de genes livres que codificam mecanismos de resistência. Por outro lado, estudos apontam o mar como uma fonte promissora de novos compostos com efeito antibiótico, muitos deles ativos contra bactérias patogênicas. Estes estudos têm colaborado no entendimento da origem e da dinâmica da resistência antimicrobiana nas comunidades bacterianas em seu habitat natural. Assim, o presente trabalho consiste em uma revisão atual e relevante da literatura no que diz respeito à importância do ambiente marinho e à sua relação com a resistência bacteriana aos antimicrobianos, e aborda aspectos gerais desse fenômeno, as principais espécies

APÊNDICE A - Resumo intitulado " *Polygonum hydropiperoides* Michx. (Polygonaceae Juss.): uma fonte natural de substâncias bioativas com efeito antibiótico" apresentado na forma de pôster no III Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas (SINCIFAR), 07 a 09 de novembro de 2018, Belo Horizonte (MG)



III Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas
07, 08 e 09 de novembro de 2018 - Belo Horizonte (MG)

***Polygonum hydropiperoides* MICHX. (POLYGONACEAE JUSS.): UMA FONTE
NATURAL DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS COM EFEITO ANTIBIÓTICO**

MORAES, W. G.¹; COSTA, Y. F. G.¹; FERNANDES, L. S.¹; BOTTARO, P. H. T.¹; FURTADO, A.
C.¹; RODRIGUES, S. P.¹; SOUSA, O. V.²; ARAÚJO, A. L. S. M.²; ALVES, M. S.¹

¹ Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

² Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG
silvana.alves@ufjf.edu.br

Introdução: *Polygonum hydropiperoides* Michx. (Polygonaceae Juss.), popularmente conhecida como erva-de-bicho, é tradicionalmente utilizada no tratamento de feridas, e como anti-hemorrágica, diurética e vermífuga. Quimicamente, apesar da diversidade de metabólitos secundários descrita no gênero *Polygonum*, incluindo compostos fenólicos e flavonoides, relatos na literatura sobre os fitoconstituintes desta planta medicinal são escassos. **Objetivos:** Quantificar o teor de fenóis e flavonoides totais e avaliar o potencial antibiótico dos extratos hexânico (EH), em acetato de etila (EAE) e etanólico (EE) das partes aéreas de *P. hydropiperoides*. **Metodologia:** Os teores de fenóis e flavonoides totais foram determinados espectrofotometricamente. O efeito antibiótico foi investigado por meio das determinações da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2012) e da concentração bactericida mínima (CBM), classificando o efeito como bactericida ou bacteriostático (ANDREWS, 2001). Cepas de referência ATCC® *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 6538™, ATCC® 25923™ e ATCC® 29213™), *Escherichia coli* (ATCC® 10536™ e ATCC® 25922™), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis (ATCC® 10708™), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC® 13311™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 9027™ e ATCC® 27853™) foram testadas. **Resultados e Discussão:** Os teores de fenóis totais variaram de 17,44 ± 1,15 a 290,91 ± 2,70 mg/g equivalente a ácido gálico (EAG) e de flavonoides totais variaram de 0,12 ± 0,06 a 20,18 ± 0,11 mg/g equivalente a quercetina (EQ). Entre os extratos investigados, EAE mostrou-se o mais eficiente, sendo ativo frente às cepas testadas, com CIM de 1250 e 5000 µg/mL para as Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. Ainda, EAE apresentou efeito bactericida para *P. aeruginosa* (ATCC® 9027™) e bacteriostático para as demais. Provavelmente, o efeito antibiótico esteja relacionado à alta presença dos compostos fenólicos. **Conclusão:** Os resultados sugerem que *P. hydropiperoides* é uma fonte natural promissora de substâncias bioativas com potencial antibiótico. **Agradecimentos:** UFJF (Projeto nº 42084), FAPEMIG (CDS-APQ-04680-10) e CAPES (Portaria 001).