



UEFS

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



PPGBIOTEC

**ISABELLA SANTOS ARAÚJO**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS AROMÁTICAS  
QUE OCORREM NO ESTADO DO PARÁ**

Feira de Santana, BA  
2011

**ISABELLA SANTOS ARAÚJO**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS AROMÁTICAS  
QUE OCORREM NO ESTADO DO PARÁ**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro;  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Angélica Maria Lucchese.

Feira de Santana, BA  
2011

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por Sua presença real em minha vida, por me sustentar a cada dia, pelo Seu amor, Sua fidelidade.

A meus pais, por todo amor, cuidado e dedicação; por me ajudarem a erguer a cabeça sempre!

Às minhas irmãs, Tati e Cássia, por estarem sempre ao meu lado!

A Robson, pela paciência e companheirismo, por ter compreendido todos os momentos em que não pude estar presente!

Agradeço a toda família PIBI, em especial a família do Pr. Hermes, pelo carinho e apoio que nunca faltaram!

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula, a minha gratidão por todos esses anos de oportunidade e confiança. Para mim, você é um grande exemplo de professora, orientadora, pesquisadora e mulher. Muito obrigada, Ana!

À Profa. Dra. Angélica, pela sua disponibilidade e apoio em todas as etapas dos testes fitoquímicos.

À Profa. Dra. Carla Mendes que me acompanhou também na triagem fitoquímica, muito obrigada pela sua colaboração!

Ao grupo de pesquisa do Museu Paraense Emílio Goeldi pelos extratos cedidos para a pesquisa.

A todos os estagiários, pesquisadores, professores e funcionários do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM), em especial, os Professores Doutores Aristóteles Góes e Helio Kamida, as funcionárias: Suzana, Clarissa e Goretti, aos biólogos: Carla, Gisele, João Ronaldo (muito obrigada pelas fotos), Getúlio,

Jacqueline, Uilma e Aline, pelos momentos de troca de conhecimento e por todas as descontrações! Muito obrigada!

A todos os estagiários, professores e funcionários do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LAPRON), em especial a bióloga Edna Peralta, estagiárias, Monick e Dayse, as doutorandas Mayara e Simone. Obrigada pelo apoio e auxílio.

Agradeço também à Universidade Estadual de Feira de Santana por fornecer as estruturas físicas para a realização dos meus experimentos, o Laboratório de Pesquisa Microbiológica (LAPEM) e o Laboratório de Produtos Naturais (LAPRON).

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTECUEFS/FIOCRUZ- pela minha formação Acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela Bolsa de estudos concedida.

Ao Programa de Pesquisa em Biodiversidade/Ministério do meio Ambiente (PPBIO/MMA) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) pelo suporte financeiro.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram de alguma forma a conquistar essa vitória!

Muito obrigada!

*“Ora, àquele que é poderoso para fazer tudo muito mais, abundantemente além, daquilo que pedimos ou pensamos, segundo o poder que em nós opera”.*

*Efésios 3:20*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1 GERAL	17
2.1.2. ESPECÍFICOS	17
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
3.1 FITOTERAPIA	18
3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	20
3.3 ANTIBIÓTICOS: MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA DE MICROORGANISMOS	26
3.4 MÉTODOS ANTIMICROBIANOS	28
3.4.1. TESTE DE DIFUSÃO EM POÇO	29
3.4.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	30
3.5CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)/TRIAGEM FITOQUÍMICA	31
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>

4.1. COLETA DE AMOSTRA BOTÂNICA, IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA E OBTENÇÃO DO EXTRATO VEGETAL BRUTO	34
4.2 MICRORGANISMOS TESTES	40
4.3 TESTES ANTIMICROBIANOS	40
4.3.1 TESTE DE DIFUSÃO EM POÇO	40
4.3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	42
4.3.3 CONCENTRAÇÃO MICROBICIDA MÍNIMA (CMM)	46
4.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA	46
4.4.1 REAGENTE ANISALDEÍDO - ÁCIDO SULFÚRICO (AS)	48
4.4.2 REAGENTE DRAGENDORF COM ÁCIDO CLORÍDRICO (DRG)	48
4.4.3 REAGENTE LIEBERMANN-BURCHARD (LB)	48
4.4.4 REAGENTE HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO (KOH)	48
4.4.5 REAGENTE PRODUTOS NATURAIS POLIETILENOGLICOL (NP/PEG)	49
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>50</b>
5.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO TESTE DE DIFUSÃO EM POÇO	50
5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO MICROBICIDA MÍNIMA (CMM)	60
5.3 TRIAGEM FITOQUÍMICA	75
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>81</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	<b>83</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Estudos de atividade antimicrobiana envolvendo as espécies utilizadas nesta pesquisa.....24
- Tabela 2.** Família botânica, espécies, data da coleta (DC), local de coleta (LC), município, coordenadas geográficas, número de registro no Herbário MG.....35
- Tabela 2.** (continuação A) Família botânica, espécies, data da coleta (DC), local de coleta (LC), município, coordenadas geográficas, número de registro no Herbário MG.....36
- Tabela 2.** (continuação B) Família botânica, espécies, data da coleta (DC), local de coleta (LC), município, coordenadas geográficas, número de registro no Herbário MG.....37
- Tabela 3.** Família botânica, espécie, código do extrato, parte da planta, solvente utilizado, rendimento do extrato (%), métodos de difusão em poço (DP), concentração inibitória mínima (CIM), concentração microbicida mínima (CMM).38
- Tabela 3.** (continuação) Família botânica, espécie, código do extrato, parte da planta, solvente utilizado, rendimento do extrato (%), métodos de difusão em poço (DP), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM).....39
- Tabela 4.** Média dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano pelo teste de difusão em poço, em mm, dos extratos, metanólicos e hexânicos, de plantas aromáticas do Pará contra os micro-organismos teste.....51
- Tabela 4.** (continuação) Média dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano pelo teste de difusão em poço, em mm, dos extratos, metanólicos e hexanólicos, de plantas aromáticas do Pará contra os microrganismos teste.....52



**Tabela 5.** Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM), em mg.mL<sup>-1</sup>, dos extratos brutos de plantas aromáticas, separadas por família.....61

**Tabela 5 - Continuação A.** Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM), em mg.mL<sup>-1</sup>, dos extratos brutos de plantas aromáticas, separadas por família.....62

**Tabela 5 – Continuação B.** Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM), em mg.mL<sup>-1</sup>, dos extratos brutos de plantas aromáticas, separadas por família.....63

**Tabela 5 – Continuação C.** Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM), em mg.mL<sup>-1</sup>, dos extratos brutos de plantas aromáticas, separadas por família.....64

**Tabela 5 – Continuação D.** Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM), em mg.mL<sup>-1</sup>, dos extratos brutos de plantas aromáticas, separadas por família.....65

**Tabela 6.** Resultado da inibição de micro-organismos testados, em porcentagem, por extratos vegetais através metodologias da difusão em poço e da concentração inibitória mínima (CIM).....71

**Tabela 7.** Resultado da triagem fitoquímica dos extratos metanólicos de *Miconia minutiflora*, *Eugenia protenta*, *Eugenia patrisii*, *Eugenia punicifolia* e *Eugenia biflora*.....77

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma das etapas metodológicas da presente pesquisa.....33
- Figuras 2A-2F.** Esquema do procedimento realizado para detecção da atividade antimicrobiana pelo método da difusão em poço. Foto: Gádea (2010).....41
- Figura 3.** Determinação da CIM utilizando-se pipeta automática multicanal. Foto: Guiutierrez (2010).....43
- Figura 4.** Esquema da placa de 96 poços para a determinação da CIM. C1; C2 e C3: Controle dos micro-organismos; EXT.: Controle do extrato CMH: Controle do meio de cultura 1x e 2x concentrados, respectivamente; M.O: Microrganismo.....45
- Figura 5:** (A) Aplicação dos extratos em placas de sílica gel (10 cm<sup>2</sup>) para eluição em sistemas de solventes. (B) Foto de amostras de extrato bruto aplicadas em placa de sílica gel para desenvolvimento da Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Foto: Guiutierrez (2010).....46
- Figura 6:** (A) Eluição das amostras dos extratos, no sistema hexano: diclorometano: acetato de etila: ácido acético (40:40:20:0,5 v/v). (B) Placa de sílica com as amostras após serem eluídas. Foto: Autora (2010).....47
- FIGURA 7.** Placas do teste de difusão em poço, após período de incubação, dos extratos metanólicos de *Centratherum punctatum* (lado esquerdo das placas) e *Eugenia protenta* (lado direito das placas) contra *S. aureus* CCMB 263 (A) e contra *Bacillus cereus* CCMB 282 (B). Foto: Vasconcellos- Neto (2010).....56
- FIGURA 8.** Placas do teste de difusão em poço, após período de incubação, dos extratos metanólicos de *Miconia minutiflora* (lado esquerdo da placa) e *Aparisthium cordatum* (lado direito da placa) contra *Candida parapsilosis* CCMB 288 (A) e *Salmonella* sp. CCMB 281 (B). Foto: Vasconcellos- Neto (2010).....57

**Figura 09:** Placas de determinação da concentração inibitória mínima. (A) Representação da diluição em série do extrato metanólico bruto do tubérculo de *Cyperus articulatus*: Colunas 1-3 contra *Escherichia coli*, CIM = 5 mg.mL<sup>-1</sup>; Colunas 4-6 contra *Staphylococcus aureus* CCMB 262 - CIM < 0,078 mg.mL<sup>-1</sup> e Colunas 7-9 contra *S. aureus* CCMB 263 - CIM = 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. (B) Extrato metanólico bruto do caule de *Croton pullei*: Colunas 1-3 contra *E. coli*, CIM = 5 mg.mL<sup>-1</sup>; Colunas 4-6 contra *S. aureus* CCMB 262 CIM < 0,078 mg.mL<sup>-1</sup> e Colunas 7-9 contra *S. aureus* CCMB 263 CIM < 0,078 mg.mL<sup>-1</sup>. C1, C2 e C3: controles de crescimento dos micro-organismos-teste; C4: Controle do extrato e C5 e C6: Controle da esterilidade do meio de cultura (CMH). Foto: Vasconcellos- Neto (2010).....67

**Figura 10.** Representação da diluição em série do extrato metanólico bruto das folhas de *Duguetia riparia*: Colunas 1-3 contra *Escherichia coli* CCMB 261, CIM < 0,078 mg.mL<sup>-1</sup>; Colunas 4-6 contra *Staphylococcus aureus* CCMB 263 - CIM = 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> e Colunas 7-9 contra *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268 CIM = 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. C1, C2 e C3: controles de crescimento dos micro-organismos-teste; C4: Controle do extrato e C5 e C6: Controle da esterilidade do meio de cultura (CMH). Foto: Vasconcellos- Neto (2010).....68

**Figura 11:** Placas de determinação da concentração inibitória mínima. (A) Representação da diluição em série do extrato hexânico de *Mansoa difficilis*: Colunas 1-3 contra *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268, CIM < 0,078 mg.mL<sup>-1</sup>; Colunas 4-6 contra *Salmonella* sp. CCMB 281 - CIM < 0,156 mg.mL<sup>-1</sup> e Colunas 7-9 contra *Bacillus cereus* CCMB 282 - CIM = 5 mg.mL<sup>-1</sup>. (B) Extrato metanólico de *Eugenia protenta*: Colunas 1-3 contra *Escherichia coli* CCMB 261, CIM = 5 mg.mL<sup>-1</sup>; Colunas 4-6 contra *Staphylococcus aureus* CCMB 263 - CIM = 1,25 mg.mL<sup>-1</sup> e Colunas 7-9 contra *P. aeruginosa* CCMB 268 - CIM < 0,078 mg.mL<sup>-1</sup>. C1, C2 e C3: controles de crescimento dos micro-organismos-teste; C4: Controle do extrato e C5 e C6: Controle da esterilidade do meio de cultura (CMH). Foto: Vasconcellos- Neto (2010).....69

**Figura 12:** Cromatoplacas dos extratos das espécies: 1- *Miconia minutiflora*, 2- *Eugenia protenta*; 3- *Eugenia patrisii*; 4- *Eugenia puniceifolia* e 5- *Eugenia biflora*, da esquerda para direita. (A) Tratamento com Reagente NP/PEG à luz visível e (B)

Tratamento com Reagente produtos Naturais NP/PEG à luz UV365. Foto: Araújo (2010).....77

**Figura 13:** Cromatoplasmas dos extratos das espécies: 1- *Miconia minutiflora*, 2- *Eugenia protenta*; 3- *Eugenia patrisii*; 4- *Eugenia puniceifolia* e 5- *Eugenia biflora*, da esquerda para direita. (A) Tratamento com Reagente LB à luz visível e (B) Tratamento com Reagente DRG. Foto: Araújo (2010).....78

**Figura 14:** Cromatoplasmas dos extratos das espécies: 1- *Miconia minutiflora*, 2- *Eugenia protenta*; 3- *Eugenia patrisii*; 4- *Eugenia puniceifolia* e 5- *Eugenia biflora*, da esquerda para direita. (A) Tratamento com Reagente AS à luz visível. (B) Tratamento com Reagente KOH à luz UV365 nm. Foto: Araújo (2010).....79

## RESUMO

Foi avaliada a atividade antimicrobiana, de 37 extratos de plantas aromáticas que ocorrem no nordeste paraense, através do teste de difusão em poço, 29 extratos, e da Concentração Inibitória Mínima CIM, 36 extratos, frente a 10 micro-organismos sendo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. Os micro-organismos mais sensíveis pelo teste de difusão em poço e pela CIM foram cepas de bactérias Gram-positivas. Comparativamente, o método da CIM mostrou-se mais sensível para a determinação da presença de atividade antimicrobiana para os extratos testados. Dos 29 extratos brutos analisados pelo método de difusão em poço, 21 extratos apresentaram atividade contra pelo menos um micro-organismo, com variação entre parte da planta, tipo de micro-organismos inibidos e solvente utilizado para maceração do extrato. As amostras dos extratos também exibiram atividade antimicrobiana na determinação da CIM, entretanto, em diferentes intensidades, dependendo do micro-organismo e do extrato estudado. A detecção de classes de metabólitos secundários foi realizada por cromatografia em camada delgada; a presença de terpenos, triterpenos, esteroides, flavonoides e alcalóides ocorreu nas 5 espécies vegetais estudadas. Os resultados *in vitro* obtidos neste trabalho indicam que estas espécies podem atuar como agentes antimicrobianos contra infecções bacterianas e por leveduras.

**PALAVRAS- CHAVE:** Atividade antimicrobiana, plantas aromáticas, Pará, micro-organismos.

## ABSTRACT

It was evaluated the antimicrobial activity of extracts of 37 herbs that occur in northeastern Pará, through the diffusion test in pit, 29 extracts, and the minimum inhibitory concentration MIC, 36 extracts, compared to 10 micro-organisms being Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and yeasts. The micro-organisms more sensitive by the pit diffusion test and MIC were strains of Gram-positive bacteria. In comparison, the MIC methods proved more sensitive for determining the presence of antimicrobial activity of the extracts tested. Of the 29 gross extracts evaluated by pit diffusion method, 21 extracts showed activity against at least one micro-organism, with variation between part of the plant, type of micro-organisms and inhibited maceration of the solvent used to extract. Samples of the extracts also exhibited antimicrobial activity in the MIC determination, however, in different intensities, depending on the micro-organism and the extract studied. The detection of classes of secondary metabolites was performed by thin layer chromatography and the presence of terpenes, terpenoids, steroids, flavonoids and alkaloids occurred in five plant species studied. The *in vitro* results obtained here indicate that these species may act as antimicrobial agents against bacterial infections and yeast.

**KEY WORDS:** Antimicrobial activity, herbs, Pará, micro-organisms.

## 1 INTRODUÇÃO

Considerando-se o uso popular dos vegetais amazônicos e a vocação regional local, os setores farmacêuticos e cosméticos, constituem o maior potencial econômico de aproveitamento sustentável da biodiversidade amazônica. O grande desafio, além de conhecer, é agregar valor aos produtos dessa biodiversidade para não levar à exaustão desses recursos sem a contrapartida do desenvolvimento regional. Estão incluídas nesta diversidade vegetal as plantas aromáticas, fornecedoras de óleos essenciais, cujo uso como agente medicinal remota à antiguidade (ANGNES, 2005). Dentre as plantas medicinais, as plantas aromáticas constituem-se como um grupo de destaque, devido, principalmente, aos óleos essenciais encontrados nos diferentes órgãos das mesmas: folhas, caules, cascas, resinas, flores, frutos e outros (NUNES et al., 2006).

Os produtos naturais são importantes fontes de substâncias biologicamente ativas e, a região amazônica constitui-se como alvo na pesquisa de novos agentes antimicrobianos, visto que é detentora de grande biodiversidade. Na Amazônia Legal já foram identificadas em torno de 650 espécies vegetais farmacológicas e de valor econômico: 540 no Estado do Pará, 488 no Amazonas, 397 em Mato Grosso, 380 no Amapá, 370 em Rondônia, 368 no Acre, 367 em Roraima e, 261 no Maranhão (CGEE, 2007).

Os extratos orgânicos são importantes fontes de compostos com atividade antimicrobiana: o uso do extrato bruto da goiabeira (*Psidium guajava* L.) no tratamento das diarreias causadas por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi demonstrado ser uma opção viável devido a sua ação curativa rápida (VIEIRA; SILVA; TOLEDO, 2005). Alguns compostos do extrato de folha de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) tem sido mencionados como eficiente na ação inibitória para o vírus Epstein-Barr, alguns fungos (OLIVEIRA et al., 2007), além de atividade antimicrobiana sobre bactérias (HOLETZ et al., 2002). Segundo Bertucci et al. (2009), 3 espécies do gênero *Eugenia* apresentaram ação inibitória sobre linhagens de *S. aureus*, *Mycobacterium*, *Candida* e *Aspergillus*.

A busca de novos agentes antimicrobianos é importante, uma vez que o elevado potencial de recombinação genética das bactérias tem provocado o aumento de cepas multirresistentes e, conseqüentemente, tornado ineficazes muitos fármacos antimicrobianos disponíveis no mercado (TRIAS; GORDON, 1997;

LABARCA, 2002; ALVAREZ; LABARCA; SALLES, 2010), logo, a busca de propriedades antibacterianas em extratos de plantas e de substâncias mais específicas tem sido incentivada e intensificada (MIGUEL; MIGUEL, 1999).

Entre os anos de 1981 a 2006, a *Food and Drug Administration* dos EUA (FDA) aprovou 1.184 novas drogas entre os quais 609 (51,4%) foram de produtos naturais relacionados: 55 delas eram produtos naturais, 270 derivados de produto natural por modificação química (semi-sintético), 52 feitos por síntese total em que o farmacóforo veio de um produto natural, e 232 sintetizados e imitando um produto natural (NEWMAN; CRAGG, 2007). Segundo Lahlou (2004), a pesquisa da atividade biológica dos extratos vegetais pode aumentar o conhecimento a respeito de espécies e gêneros botânicos, e contribuir para a sua inserção na terapêutica.

Um grande número de bioensaios é utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas. Com a finalidade encontrar o melhor agente antimicrobiano. Dentre os testes disponíveis para atividade antimicrobiana encontram-se as técnicas de difusão, diluição e os métodos automatizados (COLE, 1994).

Neste contexto, pesquisas direcionadas a testar o potencial antimicrobiano de plantas aromáticas do estado do Pará são essenciais, uma vez que estas podem proporcionar grandes chances de se agregar conhecimento às espécies estudadas, podendo contribuir para a descoberta das novas possibilidades que contribuem para o desenvolvimento de novos fármacos.

Este trabalho teve como objetivo a investigação da atividade antimicrobiana de plantas aromáticas nativas e/ou cultivadas no nordeste do estado do Pará frente a 10 micro-organismos, que incluíram linhagens padrão de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- ❖ Estudar o potencial antimicrobiano de 37 extratos (metanólicos e hexânicos) de plantas aromáticas que ocorrem no nordeste paraense.

#### 2.1.2. Específicos

- ❖ Avaliar a atividade antimicrobiana de 29 extratos brutos extraídos de plantas ocorrentes no nordeste paraense, utilizando-se a metodologia de difusão em poço, contra 10 linhagens de micro-organismos;
- ❖ Verificar a concentração inibitória mínima (CIM) de 37 extratos brutos obtidos de plantas ocorrentes no nordeste paraense;
- ❖ Comparar a sensibilidade das metodologias de difusão em poço e determinação da concentração inibitória mínima para os extratos testados;
- ❖ Detectar através da triagem fitoquímica, a presença de classes de metabólitos secundários nos extratos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana nos testes anteriores.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 FITOTERAPIA

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas, talvez, tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Diversas plantas foram utilizadas pelos indígenas como remédio para suas doenças e como veneno em suas guerras e caças (CARVALHO, 2004). O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (CALDERON et al., 2009).

Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (MACIEL; PINTO; VEIGA-JUNIOR, 2002). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a maioria da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional como fonte de cuidados de saúde primários, sendo que o uso de plantas medicinais representa cerca de 85% das iniciativas (BRASIL, 2006).

Atualmente, nota-se um interesse pelas plantas medicinais, devido à grande procura por terapias alternativas. Isto se deve principalmente à ineficácia de alguns produtos sintéticos, ao alto custo dos produtos alopáticos e a busca da população por tratamentos menos agressivos ao organismo humano, principalmente no atendimento primário à saúde (RIBEIRO; LEITE; DANTAS-BARROS, 2005; HARVEY, 2008).

As plantas que contêm compostos aromáticos são exemplos de plantas usadas tradicionalmente na medicina popular; assim como, para aumentar a vida útil dos alimentos através da inibição contra bactérias, fungos filamentosos e leveduras; na indústria farmacêutica, na medicina alternativa e de terapias naturais

(SARTORATTO et al., 2004; TEMPONE et al., 2008). Como as plantas são importantes fontes de substâncias biologicamente ativas, ou seja, substâncias que apresentam alguma atividade sobre o metabolismo de um organismo vivo, elas são indispensáveis para o desenvolvimento e a síntese de um grande número de fármacos (SANDES; DIBLASI, 2000; VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

As florestas tropicais do mundo são um dos biomas mais ricos em espécies e, provavelmente, incluem mais da metade do número de espécies na Terra (CALDERON et al., 2009). O Brasil está entre os sete países detentores da “megadiversidade”, onde se localizam 50% das espécies vegetais no mundo. A biodiversidade do Brasil não é totalmente conhecida devido a sua complexidade, mas estima-se que existam 55.000 espécies catalogadas, num total estimado entre 350.000 e 550.000 (TOLEDO et al., 2003; SILVA; RYLANDS; FONSECA, 2005). As plantas atingem uma extraordinária biodiversidade na Amazônia, estima-se que a região abrigue cerca de quarenta mil espécies de plantas vasculares, das quais trinta mil são endêmicas à região (MITTERMEIER et al., 2003).

Freqüentemente, novas espécies são adicionadas à lista da enorme diversidade e dados recentes indicam que pelo menos 40.000 espécies de plantas foram cientificamente classificadas na região (SILVA; RYLANDS; FONSECA, 2005). Na verdade, estima-se que a distribuição da flora tem sido subestimada e que a biodiversidade de plantas, provavelmente, inclui pelo menos três vezes mais espécies de plantas da Amazônia que estão atualmente conhecidas (HOPKINS, 2007). A biodiversidade das florestas tropicais constitui-se como principal fonte de biomoléculas para a produção industrial de medicamentos (REIS; MARIOT; STEENBOCK, 2004).

Este imenso patrimônio genético encontrado no Brasil tem, na atualidade, um valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades (BRASIL, 2006), mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade, uma vez que existem inúmeros medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais. Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais, sendo que 25% foram originados de plantas (CALIXTO, 2003).

A pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos é importante uma vez que apenas 8% das espécies vegetais da biota brasileira foram estudadas em termos de compostos bioativos e 1.100 espécies conhecidas foram estudadas em

suas propriedades medicinais, sendo que apenas 590 espécies foram registradas no Ministério da Saúde (NODARI; GUERRA, 2000; SIMÕES et al., 2007). Muitas plantas dos biomas brasileiros tais como, o Cerrado, a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica, têm sido utilizadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária, infecções fúngicas e bacterianas (ALVES et al. 2000; SARTORATTO et al. 2004), muitos extratos de plantas têm sido utilizados por exercer a atividade biológica *in vitro* e *in vivo* (GULLECE et al., 2006).

Através do Decreto Presidencial Nº. 5.813, de 22 de junho de 2006, o Governo Federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais, onde as ações decorrentes desta política são manifestadas no Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – PNPMF e uma das propostas do PNPMF é inserir plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia no SUS, com segurança, eficácia e qualidade, em conformidade com as diretrizes da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Isto contribui para a melhoria do acesso da população aos medicamentos, à inclusão social e regional, ao desenvolvimento industrial e tecnológico, à promoção da segurança alimentar e nutricional, além do uso sustentável da biodiversidade brasileira e da valorização e preservação do conhecimento tradicional associado às comunidades tradicionais e indígenas (BRASIL, 2007).

### 3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os compostos resultantes de reações químicas celulares são denominados metabólitos, sendo divididos em primários, os quais são fundamentais na matéria-viva, responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento do organismo (DEMAIN, 2000; DEWICK, 2002) e, secundários, aqueles que não são necessários às funções básicas intracelulares, mas que exercem funções específicas de interação organismo e ambiente, podendo ser interpretados como a interface química entre o organismo e os outros seres vivos (BRIZUELA et al., 1998; KUTCHAN, 2001).

Os vegetais, enraizados no solo, não podem responder ao meio ambiente pelas vias possíveis aos animais, necessitando produzir metabólitos como condição de adaptação e regulação (HARBORNE, 1988). Os metabólitos secundários, por

serem então fatores de interação entre organismos, na maioria das vezes apresentam atividades biológicas. Muitos destes compostos são de importância na área farmacêutica, pois representam uma fonte promissora para a descoberta de novas moléculas úteis ao homem (SANTOS, 2003; OKUNADE; ELVIN-LEWIS; LEWIS, 2004; HAIDA et al., 2007).

As vias metabólicas secundárias vegetais dão origem a diversas classes de compostos, tais como, alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos terpenóides e poliacetilenos, que por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies, cujas funções, até pouco tempo eram desconhecidas; a maioria desses metabólitos secundários que, ao menos, 12.000 foram isolados e essa quantidade ainda parece ser inferior a 10% do total (COWAN, 1999). Em muitos casos, estas substâncias servem como mecanismos de defesa do vegetal contra predação por micro-organismos, insetos, e herbívoros. Algumas substâncias fornecem odor para a planta, outros (quinonas e taninos) são responsáveis pelo pigmento e muitos compostos são responsáveis pelo sabor da planta (COWAN, 1999).

Considerando-se que a diversidade molecular dos produtos naturais é superior àquela derivada dos processos de síntese química, os vegetais são excelentes fontes de matéria-prima na busca de novas drogas. A fantástica variedade e complexidade de metabólitos biossintetizados pelas plantas sofrem a influência dos estímulos ambientais, bastante variáveis, de natureza química, fisiológica e biológica, sobre sua composição química, sintetizando moléculas de estruturas complexas e com grande diversidade de esqueletos e grupos químicos funcionais (ALVES et al., 2001; RISSATO; ALMEIDA; SILVA, 2004).

Nos anos 80, o desenvolvimento da pesquisa científica resultou na identificação de 121 compostos de origem vegetal, provenientes de 95 espécies de plantas (ALVES et al., 2001), foi a partir dessa década que o interesse em encontrar agentes antimicrobianos naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico aumentou consideravelmente (RAUHA et al., 2000). Os compostos de origem vegetal demonstram uma grande importância na medicina moderna, pois entre 1984 e 1994, dos medicamentos aprovados pelo Ministério da Saúde, 6% foram extraídos diretamente de espécies vegetais, 24% foram produzidos a partir de produtos derivados de vegetais e 9% foram desenvolvidos através da modelagem molecular de estruturas químicas de compostos vegetais que serviram como

protótipos, sendo que, atualmente metade dos 25 medicamentos de maior utilização no mundo foi originada de metabólitos secundários dos vegetais (ALVES et al., 2001). Além disso, no período de 1941 a 2002, dos 90 fármacos analisados no *Annual Reports of Medicinal Chemistry*, 61 eram derivados semi-sintéticos de plantas e 9 eram oriundos de produtos naturais (SILVEIRA et al., 2009).

A OMS estima que mais de 65% da população dos países desenvolvidos utilizem plantas medicinais para cuidados básicos com a saúde. Devido à atividade metabólica secundária dos vegetais superiores, estes produzem substâncias antibióticas como mecanismo de defesa contra predação por micro-organismos, insetos e herbívoros (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Plantas superiores e aromáticas são amplamente utilizadas na medicina popular, uma vez que apresentam amplo espectro de atividade e inibição comprovada contra bactérias e fungos (HULLIN et al., 1998; DUARTE, 2004). Atualmente, estudos sobre atividades de produtos naturais têm sido enfatizados e eles buscam, principalmente, a atividade destes sobre micro-organismos, uma vez que, as drogas existentes se tornam menos eficazes diante dos mecanismos de resistência (COUTINHO et al., 2003/2004).

Existe um número significativo de famílias e espécies de plantas que foram estudadas recentemente. Entretanto, se levarmos em conta a existência das cerca de 300.000 espécies de plantas conhecidas, muito trabalho ainda tem de ser feito. Para a maioria das plantas, somente uma das partes, como folha, raiz ou caule, ou somente um tipo de preparação como óleo essencial ou extrato foram estudados (HELANDER et al., 1998 *apud* DUARTE, 2006).

Em geral, a atividade antimicrobiana tem sido atribuída a pequenos terpenóides e compostos fenólicos como timol, carvona, carvacrol, mentol e muuroleno, que também na forma pura exibem atividade antibacteriana ou antifúngica. Apesar dos mecanismos de ação estar incipientemente caracterizados, estes parece estar associado ao caráter lipofílico dos compostos, havendo um acúmulo em membranas e perda de energia pelas células. As diferenças com respeito às técnicas empregadas para investigação da ação de compostos de plantas e uma grande variação encontrada na composição química de algumas preparações vegetais podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas. Não existe também um consenso sobre os níveis de inibição aceitáveis

para compostos de plantas, quando comparados com antibióticos padrões (DUARTE, 2006).

É importante destacar que dos 37 extratos vegetais avaliadas, referente a 30 espécies, não foram encontradas quaisquer investigação científica prévia relacionada à atividade antimicrobiana de 24 espécies (Tabela 1).

**Tabela 1.** Estudos de atividade antimicrobiana envolvendo as espécies utilizadas nesta pesquisa.

ESPÉCIE	PREPARO	MICROORGANISMOS	REFERÊNCIA
<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	Óleo essencial	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida albicans</i>	SANTANA et al., 2008
<i>Wedelia paludosa</i> DC.	Frações de hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol, obtidos do extrato bruto metanólico das flores	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	SARTORI, 2005
<i>Calycolpus goetheanus</i> (DC.) O. Berg	Óleo essencial	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida albicans</i>	SANTANA et al., 2008
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	Óleo essencial	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Serratia marcescens</i> e <i>Candida albicans</i>	BANDEIRA, et al., 2006
<i>Cyperus articulatus</i> L.	Óleo essencial e extrato etanólico das folhas	<i>Candida albicans</i>	DUARTE et al., 2005
<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.	Óleo essencial	Antimicrobiana; Fungitóxica; Fungicida	Iwu, et al., 1990; Singh, et al., 1992; Singh, et al., 1997

Estudos realizados por Sartori (2005); comprovaram que extratos de flores da planta *Wedelia paludosa* (Asteraceae) apresentou atividade antimicrobiana contra as seguintes bactérias: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus agalactiae*, mas não apresentaram atividade contra



leveduras. Os compostos ácido caurenóico e luteolina puros, isolados de *Wedelia paludosa* inibiram o crescimento de bactérias Gram-positivas, sugerindo que estes compostos isoladamente ou em conjunto com outros compostos sejam os responsáveis pela atividade antimicrobiana da planta em estudo.

Estudos realizados por Vallilo et al. (2008), mostraram atividade antimicrobiana em integrantes da família Myrtaceae (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg), o extrato vegetal liofilizado das folhas apresentou atividade antimicrobiana em relação à *Staphylococcus aureus*, *Salmonella cholerasuis* e *Candida albicans*. Das espécies do gênero *Eugenia* (família Myrtaceae), poucas foram amplamente estudadas do ponto de vista farmacológico, a exemplo da *Eugenia caryophyllata* Tunb. para a qual foram relatadas atividade antibacteriana, contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas putida* (OUSSALAH et al., 2007).

Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas incluem: terpenóides, alcalóides, lectinas, polipeptídeos, substâncias fenólicas e polifenóis (fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonóides), taninos e cumarinas (RESCHKE; MARQUES; MAYWORM, 2007; HAIDA et al., 2007). Os compostos isolados de plantas são substâncias com estruturas químicas bem diferenciadas dos antimicrobianos obtidos a partir de bactérias, leveduras e de fungos. Tais produtos podem atuar no metabolismo intermediário ativando enzimas, alterando a ação de inibidores que influenciam os nutrientes do meio, interferindo nos processos enzimáticos em nível nuclear ou ribossomal, provocando alterações nas membranas ou interferindo no metabolismo secundário (LIMA, 2001).

Como as plantas medicinais produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, é esperado que programas de triagem possam descobrir compostos candidatos para o desenvolvimento de novos antibióticos (AHMAD; BEG, 2001). Entretanto, as investigações científicas visando determinar o potencial terapêutico das plantas são limitadas, existindo a falta de estudos científicos experimentais que confirmem as possíveis propriedades antibióticas de um grande número dessas plantas. Espera-se que compostos que atinjam, nas células, alvos diferentes daqueles utilizados pelos antibióticos conhecidos, sejam ativos contra patógenos resistentes (DUARTE, 2006).

### 3.3 ANTIBIÓTICOS: MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA DE MICRO-ORGANISMOS

Os antibióticos são produtos metabólicos naturais de fungos, actinobactérias e bactérias capazes de impedirem o crescimento, ou de destruírem microorganismos (BLACK, 2002; MADIGAN et al., 2010). Esta definição exclui os compostos sintéticos que, juntamente com os compostos naturais e seus derivados, são denominados antimicrobianos (GOODMAN et al., 2003).

Agentes antimicrobianos vêm sendo utilizados desde o século XVII para o tratamento de doenças infecciosas. Um agente antimicrobiano ideal exibe toxicidade seletiva, e isto implica que uma substância deve ser eficiente contra a bactéria alvo, porém seguro quanto à toxicidade ao paciente (DAVIS, 1987; RANG; DALE; RITTER, 2001; BROOKS et al., 2008; SOFIATI, 2009). Os antibióticos podem agir sobre as bactérias susceptíveis afetando seu crescimento e reprodução, causando um efeito bacteriostático, e/ou induzindo sua morte, causando um efeito bactericida (FERREIRA, 2007).

O mecanismo de ação da maioria dos antimicrobianos não está totalmente esclarecido, mas, podem ser divididos em 4 categorias: (I) inibição da síntese da parede celular; (II) inibição da função da membrana celular; (III) inibição da síntese de proteínas; (IV) inibição da síntese de ácidos nucléicos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2003; BLACK, 2002; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; MADIGAN, et al., 2010).

As bactérias adotam mecanismos, a fim de sobreviverem à ação letal dos antibióticos e quimioterápicos, que incluem a resistência, a tolerância e a persistência (FREITAS, 1989; VAN ASSETT, 1996). No caso da resistência, a bactéria continua proliferando, isto é, mantém a mesma velocidade de crescimento mesmo ao ser tratada com o antibiótico. Na tolerância, o crescimento é inibido, mas o número de bactérias viáveis não sofre alteração por longo período. De fato a bactéria desenvolve defesa apenas contra o efeito bactericida do antibiótico onde, o sucesso terapêutico somente será alcançado quando a concentração do antibiótico alcançar o valor da concentração mínima bactericida (CMB), definida como a menor concentração do antibiótico capaz de matar 99,9% das bactérias presentes. Finalmente, na persistência, uma pequena fração da população bacteriana, submetida ao tratamento, não sofre o efeito bactericida do antibiótico,

independentemente de seu mecanismo de ação (JACOBY, 2005; ANDERSON, 2005).

Esses mecanismos de defesa têm grande importância clínica, porém, no caso da resistência, o fracasso terapêutico é total, restando, como única opção de tratamento, a substituição do antibiótico por outro ao qual a bactéria seja sensível (MIN et al., 2007).

A terapia antimicrobiana não apenas reduziu acentuadamente a taxa de morbidade e mortalidade humanas causadas por infecções, como também evitou a ocorrência de várias doenças (COHEN, 1992; KUHNER; MARQUES, 2003; MOREIRA, 2004 *apud* SILVA et al., 2010). Mas, simultaneamente ao crescente desenvolvimento de vários agentes antibacterianos, ocorreu também um aumento rápido na incidência de resistência antibacteriana (NORRBY; NORD; FINCH, 2005).

A resistência aos antimicrobianos é um processo genético relacionado à existência de genes no micro-organismo que codificam diferentes mecanismos e evitam a ação das drogas. Ela pode ter origem em mutações que ocorrem no micro-organismo durante seu processo reprodutivo ou através do intercâmbio de material genético (transferência horizontal gênica – THG) através da conjugação, transdução e transformação (TAVARES, 2000; UETANABARO; GÓES-NETO, 2006). A resistência é necessariamente específica contra um determinado antibiótico naqueles micro-organismos produtores desta mesma substância (TAVARES, 2000).

As bactérias também podem desenvolver resistência aos antibióticos por meio de alguns mecanismos bioquímicos já bem difundidos na literatura (JACOBY, 2005; HOOPER, 2005; BOMONO; SZABO, 2006; MIN et al., 2007). Os mecanismos incluem:

- a) modificação química do antibiótico, através de enzimas específicas;
- b) alteração do sítio de ligação do antibiótico;
- c) substituição do sítio de ligação da droga;
- d) diminuição da permeabilidade ao antibiótico;
- e) aumento da síntese de substrato com o qual a droga compete;
- f) síntese de proteínas protetoras dos ribossomos.

Os fatores que contribuem para a ocorrência e persistência da resistência bacteriana são: o uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos (CRISAN et al., 1995; VARGAS et al., 2004), a utilização de antibióticos para o tratamento e prevenção de infecções em animais e no controle de infecção

bacteriana em frutas e legumes que aumentam a transmissão de organismos multirresistentes para seres humanos (COHEN, 1992; HOEFEL et al., 2006).

A importância das substâncias antimicrobianas no aumento do fenômeno da resistência reside no seu papel selecionador dos exemplares resistentes, através da pressão seletiva resultante de seu emprego clínico, industrial, comercial e experimental. O mau uso clínico dos antimicrobianos exerce papel selecionador das estirpes resistentes e, provavelmente, é a principal causa da resistência (TAVARES, 2000).

O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva de uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta. Portanto, devem ser tomadas atitudes que possam reduzir este problema como, por exemplo, controlar o uso de antibióticos e, desenvolver pesquisas para melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e continuar o estudo de desenvolvimento de novas drogas, tanto sintéticas como naturais (NASCIMENTO et al., 2000; HAIDA et al., 2007).

Através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 44, de 26 de outubro de 2010 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária ratifica e estabelece os critérios, de forma mais rigorosos, para a embalagem, rotulagem, liberação e controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos (lista de antimicrobianos registrados na ANVISA), de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. A liberação destes medicamentos contendo as substâncias antimicrobianas fica sujeita à retenção de receita e escrituração em farmácias e drogarias, nos termos desta resolução (BRASIL, 2010).

A necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem estudadas no combate a esses micro-organismos representam um desafio no tratamento de infecções (CATÃO et al., 2005). Nesse sentido, as plantas constituem-se importantes fontes de substâncias biologicamente ativas, servindo para o desenvolvimento e a síntese de um grande número de fármacos (SANDES; DIBLASI, 2000; HAIDA et al., 2007).

### 3.4 MÉTODOS ANTIMICROBIANOS

Segundo o CLSI (2003a), os testes de sensibilidade a antimicrobianos, são indicados para qualquer organismo que cause um processo infeccioso e exija uma terapia antimicrobiana, quando for possível prever a sensibilidade deste

organismo, podem ser utilizados para verificar a sensibilidade *in vitro* dos micro-organismos frente aos agentes antimicrobianos.

Apesar dos mecanismos de ação estarem pouco caracterizados eles parecem estar associados ao caráter lipofílico dos compostos, havendo um acúmulo em membranas e perda de energia pelas células. Não existe um consenso sobre os níveis de inibição aceitáveis para compostos de plantas, quando comparados com antibióticos padrões (DUARTE, 2006).

Uma grande variedade de métodos pode ser empregada para medir a atividade *in vitro* de micro-organismos contra os agentes antimicrobianos (SILVEIRA et al., 2009). Atualmente, existem vários métodos disponíveis para a detecção da atividade antimicrobiana de produtos naturais, estes métodos são classificados em três grupos, incluindo os métodos de difusão em ágar, bioautográfico e diluição. Os métodos de bioautografia e difusão são conhecidos como técnicas qualitativas uma vez que estes métodos apenas demonstram a presença ou ausência de substâncias com atividade antimicrobiana. Por outro lado, os métodos de diluição são considerados ensaios quantitativos, uma vez que determinam a concentração inibitória mínima (VALGAS et al., 2007).

Segundo Ostrosky et al. (2008), existem diversos fatores que afetam a suscetibilidade do método de difusão e de diluição, tais como: meios de cultura, disponibilidade de oxigênio, inóculo, pH e condições de incubação; diante disso existe a necessidade do conhecimento das condições experimentais e padronização rigorosa na execução do teste.

#### 3.4.1. TESTE DE DIFUSÃO EM POÇO

O teste de difusão em ágar é um método físico, no qual um micro-organismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo com a concentração da substância ensaiada (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003). Na técnica de perfuração em ágar, a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicação das substâncias a serem analisadas (OSTROSKY et al., 2008). Fundamenta-se na difusão da substância a ser ensaiada, em um meio de cultura sólido, inoculado com o micro-organismo. A partir da difusão ocorre o aparecimento

de um halo, no qual não há crescimento do micro-organismo, denominado halo de inibição (VANDEN BERGH; VLIETINCK, 1991).

O método da difusão é mais adequado para avaliar compostos polares de tamanho molecular pequeno e médio e para determinar o espectro antimicrobiano, pois neste teste podem ser utilizados vários compostos contra um micro-organismo (ALVES et al., 2008). Neste método um micro-organismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo com a concentração da substância ensaiada (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003) e a presença de partículas em suspensão na amostra a ser testada apresenta menor possibilidade de interferir na difusão da substância antimicrobiana no ágar do que no papel de filtro disco, em que a precipitação de substâncias insolúveis em água no disco certamente evitam a difusão de substâncias antimicrobianas no ágar (HOLETZ et al., 2002).

Apesar da difusão em poço ser considerada como uma técnica qualitativa, a fim de expressar o resultado do teste, foi realizada a medição dos halos formados ao redor dos poços para comparação destes resultados com os obtidos pela CIM, conforme também foi realizado por Orlando (2005) e por Silveira et al. (2009). Segundo Sejas et al. (2003) e Madigan et al. (2010) acreditam que o diâmetro do halo de inibição de crescimento do micro-organismo é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima.

### 3.4.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A CIM corresponde à menor concentração de agente capaz de inibir completamente o crescimento do organismo teste (RICARDO, 2008; MADIGAN et al., 2010).

O ensaio para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), ou “Minimum Inhibitory Concentration” (MIC), é obtido através da macro ou microdiluição de compostos que consiste em se preparar diluições sucessivas do antimicrobiano a ser testado, em meios de cultura sólida ou líquida, semear o micro-organismo e após a incubação verificar a menor concentração (maior diluição) do antimicrobiano que inibiu o crescimento do micro-organismo (CLSI, 2002; 2003a).

Ensaio de diluição são aqueles nos quais os extratos ou substâncias a serem testadas são adicionados a um meio de cultura líquido, previamente

inoculado com o micro-organismo teste (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991). No método de diluição em caldo podem ser empregadas as metodologias: macro ou microdiluição; esse teste considera a relação entre a densidade da turbidez de crescimento do micro-organismo testado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada; a avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Após incubação, o crescimento do micro-organismo é determinado pela leitura visual direta ou turbidimétrica pelo uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado (SILVEIRA et al., 2009), assim como, pode-se mensurar a viabilidade e proliferação das células através de corantes indicadores de oxi-redução como Alamar blue e Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (DUARTE et al., 2005).

As vantagens deste método é proporcionar mais informações quantitativas, poder ser aplicado a uma variedade mais ampla de isolados do que os testes de difusão (KONEMAN et al., 2001), além de requerer uma pequena quantidade de amostra, ser barato, ter reprodutibilidade, ser 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura e possibilitar um registro permanente (OSTROSKY et al., 2008).

As variações referentes à determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a concentração de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL et al., 2004).

### 3.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) / TRIAGEM FITOQUÍMICA

A cromatografia em camada delgada objetiva a separação de misturas em seus vários componentes. A separação cromatográfica é de cunho interfacial, sendo que as superfícies imiscíveis, fases móvel e estacionária, podem ser gás-sólido, gás-líquido, líquido-líquido e a utilizada neste trabalho líquido-sólido por CCD, que consiste na separação dos componentes de uma mistura pela migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. A CCD é uma das técnicas de separação mais amplamente utilizadas em laboratórios

relacionados à Química de Produtos Naturais (Fitoquímica) e análises orgânicas, sendo amplamente utilizada devido ao seu alto nível de reprodutibilidade, rapidez na separação, alta sensibilidade e por ser comparativamente mais viável economicamente (SANTOS et al., 2007). De acordo com Adwan et al. (2006), as plantas contêm inúmeros constituintes, e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas distintas que podem interagir contribuindo para a mesma atividade. Segundo Nascimento et al. (2008), a constituição química de espécies vegetais pode ser influenciada qualitativamente e quantitativamente por variações climáticas, com repercussão direta sobre a atividade biológica.

Na caracterização fitoquímica de produtos naturais, a cromatografia é uma das técnicas mais utilizadas atualmente para o isolamento de metabólitos secundários, sendo a Cromatografia em Coluna Aberta (CCA), Cromatografia em Camada Delgada (CCD) aplicadas primeiramente na etapa de identificação (PEREIRA; AQUINO-NETO, 2000).



#### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 1 mostra um fluxograma da parte experimental realizada neste trabalho.

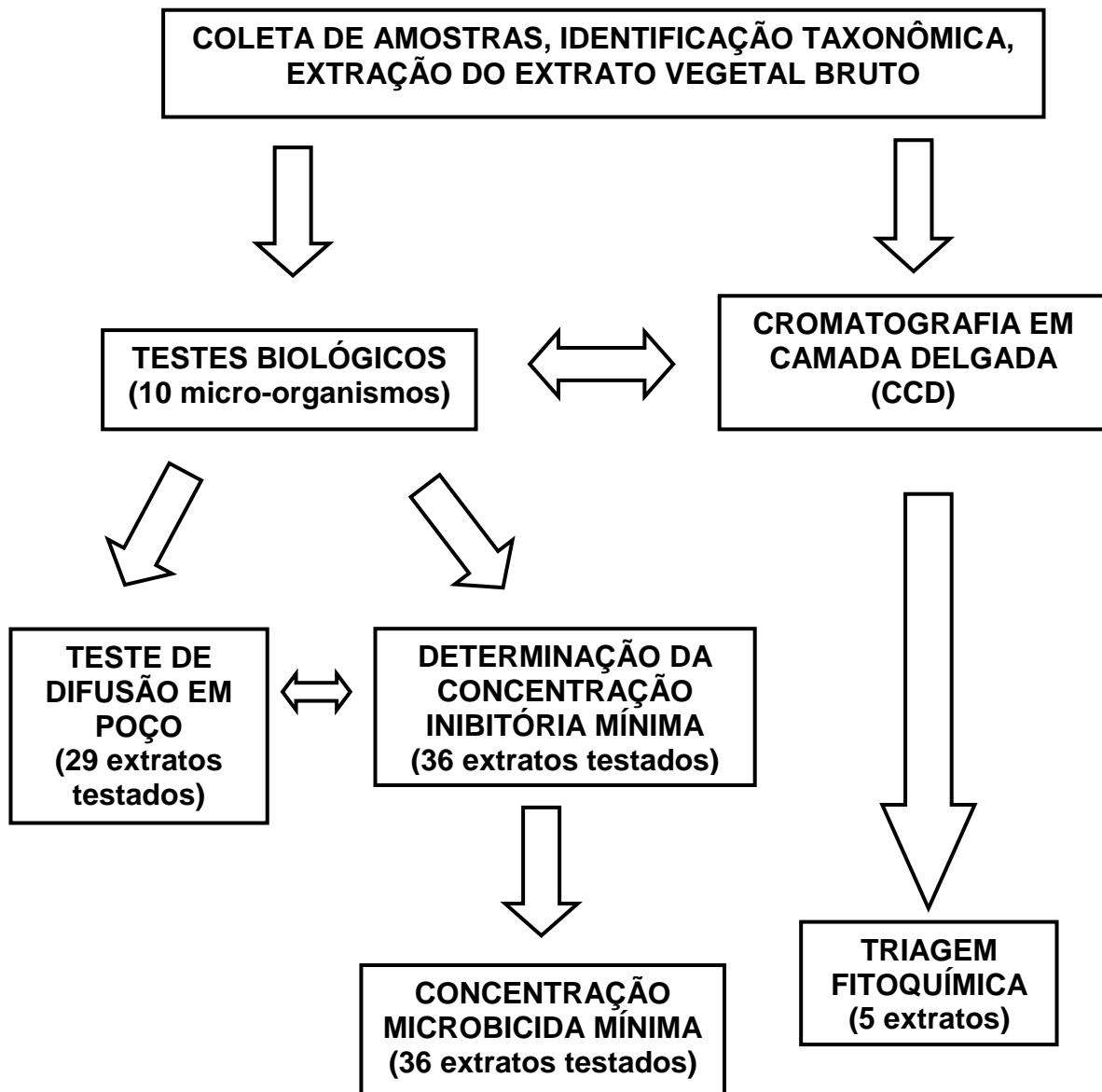


Figura 1. Fluxograma das etapas metodológicas da presente pesquisa.

#### 4.1. COLETA DE AMOSTRAS BOTÂNICAS, IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA E EXTRAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL BRUTO.

A coleta das amostras botânicas foi realizada pelo grupo de pesquisa da Dra. Maria das Graças Zoghbi do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG, Belém/PA) de forma aleatória. Não foram coletadas amostras de espécies ameaçadas de extinção, troncos ou raízes. A lista das espécies, data de coleta, local de coleta, município, coordenadas e número de registro estão exibidas nas tabelas 2; a lista das espécies, famílias botânicas, parte da planta estudada, solvente utilizado, rendimento do extrato, tipo de teste antimicrobiano realizado estão exibidas nas Tabelas 3. A obtenção dos extratos vegetais bruto foi realizada no MPEG e fornecidos à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC, Bahia) para a pesquisa. Os extratos utilizados foram preparados a partir de amostras secas de partes distintas das plantas, tais como: folhas, folhas e caules, parte aérea, planta inteira e tubérculos. As amostras botânicas foram secas, em salas equipadas com ar-condicionado e desumidificador até completar 7 dias a partir da data de coleta; moídas em moinho de facas e maceradas a frio durante 48h, com metanol ou hexano, numa porção massa/solvente de 1:4. Em seguida, foram filtradas e novamente maceradas por mais 48h e, as soluções extrativas evaporadas em evaporador rotativo. Amostras com código FAP foram secas em estufa a 40°C por 48h antes da maceração. Os extratos de *Croton pullei*, *Cyperus articulatus*, *C. giganteus* e *Mansoa difficilis* foram preparados na Universidade Federal do Pará pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giselle Maria Skelding Pinheiro Guilhon, diferindo apenas no período de maceração que foi de uma semana, filtração e nova maceração por mais uma semana.

**Tabela 2.** Família botânica, espécies, data da coleta (DC), local de coleta (LC), município, coordenadas geográficas, número de registro no Herbário MG.

<b>Família</b>	<b>Nome científico</b>	<b>DC</b>	<b>LC</b>	<b>Município</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Registro</b>
Annonaceae	<i>Annona densicoma</i> Mart.	jun/05	Comunidade Vista Alegre	Santarém Novo	S00°55'34" W047°15'30"	177.939
	<i>Annona paludosa</i> Aubl.	set/07	Restinga da praia Marco	Maracanã	S00°35'50" W47°26'35"	188.768
	<i>Duguetia echinophora</i> R. E. Fr.	set/07	Restinga da praia Marieta	Maracanã	S00°35'50" W47°26'35"	188.767
	<i>Duguetia riparia</i> Huber	set/07	Restinga da praia Marieta	Maracanã	S00°35'50" W47°26'35"	188.770
	<i>Rollinia exsucca</i> (DC. ex Dunal) A. DC.	set/07	Restinga da praia Marco	Maracanã	S00°35'50" W47°26'35"	188.767
Asteraceae	<i>Centratherum punctatum</i> Cass.	jul/08	Campus do MPEG	Belém	S01°29'18" W48°42'02"	A
	<i>Wedelia paludosa</i> DC.	jul/05	Comunidade Faustina	Santarém Novo	S00°51'57" W047°19'26"	177.972
Bignoniaceae	<i>Mansoa difficilis</i> (Cham.) Bureau & K. Schum	mar/08	Km 47 do Ramal da Colônia Terra Amarela	Santa Luzia do Pará	-	196.791
	<i>Mansoa difficilis</i>	mar/08	Km 47 do Ramal da Colônia Terra Amarela	Santa Luzia do Pará	-	196.791
	<i>Mansoa difficilis</i>	set/08	Km 47 do Ramal da Colônia Terra Amarela	Santa Luzia do Pará	-	196.791
Burseraceae	<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	set/07	Restinga da praia Marieta	Maracanã	S00°35'50" W47°26'35"	190.011

a) identificada por comparação com a exsicata MG 175.179; b) identificada por comparação com a exsicata MG 148.311; c) identificada por comparação com a exsicata MG 175.133; d) identificada por comparação com a exsicata MG 177.966; e) identificada por comparação com a exsicata MG 31.137.

**Tabela 2.** (continuação A) Família botânica, espécies, data da coleta (DC), local de coleta (LC), município, coordenadas geográficas, número de registro no Herbário MG.

<b>Família</b>	<b>Nome científico</b>	<b>DC</b>	<b>LC</b>	<b>Município</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Registro</b>
	<i>Cyperus articulatus</i>	nov/02	Comunidade Boa Vista	Acará	-	167.612
Cyperaceae	<i>Cyperus giganteus</i> Vahl	fev/03	Campus do MPEG	Belém	S01°26'58" W48°26'44"	167.658
	<i>Cyperus giganteus</i>	fev/03	Campus do MPEG	Belém	S01°26'58" W48°26'44"	167.658
	<i>Aparisthium cordatum</i> Baill.	jun/05	Comunidade Vista Alegre	Santarém Novo	S00°55'34" W047°15'30"	177.945
Euphorbiaceae	<i>Croton pullei</i> Lanj.	dez/07	Vila Ananin	Peixe-Boi	-	B
	<i>Croton pullei</i>	dez/07	Vila Ananin	Peixe-Boi	-	B
	<i>Croton trinitatis</i> Millsp.	nov/08	Campus do MPEG	Belém	S01°29'18" W48°42'02"	C
Lamiaceae	<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.	jun/05	Comunidade Iraquara	Santarém Novo	S00°57'37" W47°13'30"	D
Lauraceae	<i>Cassytha americana</i> Nees	ago/07	Restinga da praia do Atalaia	Salinópolis	S00°35'50" W47°26'35"	188.744
	<i>Ocotea longifolia</i> Kunth	jun/05	Comunidade Vista Alegre	Santarém Novo	S00°55'34" W47°15'30"	177.946

a) identificada por comparação com a exsicata MG 175.179; b) identificada por comparação com a exsicata MG 148.311; c) identificada por comparação com a exsicata MG 175.133; d) identificada por comparação com a exsicata MG 177.966; e) identificada por comparação com a exsicata MG 31.137.

**Tabela 2.** (continuação B) Família botânica, espécie, data da coleta (DC), local de coleta (LC), município, coordenadas geográficas, número de registro no Herbário MG

Família	Nome científico	DC	LC	Município	Coordenadas	Registro
Melastomataceae	<i>Miconia minutiflora</i> (Bonpl.) DC.	jul/08	Campus do MPEG	Belém	S01°29'18" W48°42'02"	E
	<i>Calycolpus goetheanus</i> (DC.) O. Berg	fev/07	Comunidade Vila da Penha	Maracanã	S00°35'50" W47°26'35"	181.808
	<i>Eugenia biflora</i> (L.) DC.	fev/07	Comunidade Vila da Penha	Maracanã	S00°39'00" W047 °28'29"	181.807
	<i>Eugenia biflora</i>	ago/07	Comunidade Vila da Penha	Maracanã	S00°35'50" W47°26'35"	188.763
	<i>Eugenia patrisii</i> Vahl	jun/05	Comunidade Vista Alegre	Santarém Novo	S00°55'34" W47 °15'30"	177.944
Myrtaceae	<i>Eugenia patrisii</i>	set/07	Restinga da praia Marieta	Maracanã	S00°35'50" W47°26'35"	190.002
	<i>Eugenia puniceifolia</i> (Kunth) DC.	set/07	Restinga da praia Marieta	Maracanã	S00°35'50" W47°26'35"	189.997
	<i>Eugenia protenta</i> McVaugh	set/08	Mata do Jari	Santarém Novo	S00°54'50" W47o23'57"	178.395
	<i>Myrcia rufipila</i> McVaugh	set/07	Restinga da praia Marieta	Maracanã	S00°35'50" W47°26'35"	190.014
	<i>Myrcia sylvatica</i> (G. Mey) DC.	fev/07	Comunidade Vila da Penha	Maracanã	S00°35'50" W47°26'35"	181.813
Piperaceae	<i>Piper tuberculatum</i> Jacq.	jul/08	Campus do MPEG	Belém	S01°27'01" W48°26'43"	177.747
Rutaceae	<i>Ertela trifolia</i> (L.) Kuntze	jul/05	Comunidade Fortaleza	Santarém Novo	S00°50'27" W47 °16'06"	177.965
	<i>Esenbeckia almawillia</i> Kaastra	set/07	Restinga da praia Marieta	Maracanã	S00°35'50" W47°26'35"	190.003
Siparunaceae	<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	jun/05	Comunidade Vista Alegre	Santarém Novo	S00°55'34" W47 °15'30"	177.936
Zingiberaceae	<i>Hedychium coronarium</i> J. König	jul/05	Margem do Igarapé do Bacuri	Santarém Novo	S00° 55'45" W47° 23'55"	177.976

a) identificada por comparação com a exsicata MG 175.179; b) identificada por comparação com a exsicata MG 148.311; c) identificada por comparação com a exsicata MG 175.133; d) identificada por comparação com a exsicata MG 177.966; e) identificada por comparação com a exsicata MG 31.137.

**Tabela 3.** Família botânica, espécie, código do extrato, parte da planta, solvente utilizado, rendimento do extrato (%), métodos de difusão em poço (DP), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM).

Família	Espécie	Parte da planta	Solvente	%	DP	CIM	CMM	Código
Annonaceae	<i>Annona densicoma</i>	Folha	MeOH	7,56	X	X	X	BPM-29-F
	<i>Annona paludosa</i>	Folha	MeOH	16,32	X	X	X	BPM-275-F
	<i>Duguetia echinophora</i>	Folha	MeOH	13,7	X	X	X	BPM-271-F
	<i>Duguetia riparia</i>	Folha	MeOH	4,98	X	X	X	BPM-281-F
	<i>Rollinia exsucca</i>	Folha	MeOH	14,81	X	X	X	BPM-276-F
Asteraceae	<i>Centratherum punctatum</i>	Parte aérea	MeOH	15,1	X	X	X	FAP-05
	<i>Wedelia paludosa</i>	Folha	Hexano	8,4	X	X	X	BPM-70-PA
Bignoniaceae	<i>Mansoa difficilis</i>	Folha	Hexano	2,2	-	X	X	GIS-UNA-HEX
	<i>Mansoa difficilis</i>	Folha	MeOH	18,5	-	X	X	GIS-UNA-ME
	<i>Mansoa difficilis</i>	Folha	MeOH	7,21	X	X	X	FAP-03
Burseraceae	<i>Protium heptaphyllum</i>	Caule fino	MeOH	12,7	X	X	X	BPM-279-GF
Cyperaceae	<i>Cyperus articulatus</i>	Tubérculo	Hexano	2,2	-	X	X	GIS-PRI-HEX
	<i>Cyperus articulatus</i>	Tubérculo	MeOH	6,2	-	X	X	GIS-PRI-ME
	<i>Cyperus giganteus</i>	Rizoma	Hexano	1,7	-	X	X	GIS-TAB-HEX
	<i>Cyperus giganteus</i>	Rizoma	MeOH	6,6	-	X	X	GIS-TAB-ME
Euphorbiaceae	<i>Aparisthium cordatum</i>	Folha e caule fino	MeOH	7,82	X	X	X	BPM-35-FGF
	<i>Croton pullei</i>	Caule	Hexano	0,6	-	X	X	GIS-CRO-HEX
	<i>Croton pullei</i>	Caule	MeOH	7,9	-	X	X	GIS-CRO-ME
	<i>Croton trinitatis</i>	Folha	MeOH	14,66	X	X	X	FAP-01
Lamiaceae	<i>Hyptis suaveolens</i>	Parte aérea	MeOH	5,48	X	X	X	BPM-51-PA

**Tabela 3.** (continuação) Família botânica, espécie, código do extrato, parte da planta, solvente utilizado, rendimento do extrato (%), métodos de difusão em poço (DP), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM).

<b>Família</b>	<b>Espécie</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Solvente</b>	<b>%</b>	<b>DP</b>	<b>CIM</b>	<b>CMM</b>	<b>Código</b>
Lauraceae	<i>Cassytha americana</i>	Planta inteira	Hexano	1,31	X	X	X	BPM-227-PI
	<i>Ocotea longifolia</i>	Folha e caule fino	MeOH	5,32	X	X	X	BPM-36-FGF
Melastomataceae	<i>Miconia minutiflora</i>	Folha	MeOH	10,91	X	X	X	FAP-02
Myrtaceae	<i>Calycolpus goetheanus</i>	Folha	Hexano	1	X	X	X	BPM-189-F
	<i>Eugenia biflora</i>	Folha	MeOH	11,3	X	X	X	BPM-249-F
	<i>Eugenia biflora</i>	Folha	Hexano	1,9	X	X	X	BPM-188-F
	<i>Eugenia patrisii</i>	Folha e caule fino	MeOH	13,02	X	X	X	BPM-34-FGF
	<i>Eugenia patrisii</i>	Folha	MeOH	16,27	X	X	X	BPM-268-F
	<i>Eugenia protenta</i>	Folha	MeOH	14,92	X	X	X	FAP-04
	<i>Eugenia puniceifolia</i>	Folha	MeOH	10,47	X	X	X	BPM-261-F
	<i>Myrcia cf. sylvatica</i>	Folha	Hexano	0,74	X	X	X	BPM-198-F
	<i>Myrcia rufipila</i>	Folha	MeOH	17,28	X	X	X	BPM-283-F
Piperaceae	<i>Piper tuberculatum</i>	Folha	MeOH	9,13	X	X	X	FAP-06
Rutaceae	<i>Ertela trifolia</i>	Planta inteira	MeOH	7,89	X	X	X	BPM-62-PI
	<i>Esenbeckia almawillia</i>	Folha	MeOH	11,25	X	X	X	BPM-269-F
Siparunaceae	<i>Siparuna guianensis</i>	Folha e caule fino	MeOH	8,68	X	X	X	BPM-26-FGF
Zingiberaceae	<i>Hedychium coronarium</i>	Caule	MeOH	2,64	X	-	-	BPM-75-C

## 4.2 MICRORGANISMOS TESTES

Os microrganismos utilizados neste estudo foram obtidos da Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS, BA), sendo eles: *Escherichia coli* CCMB 261, sensível à trimetoprima e resistente à sulfonamida; *Salmonella* sp. CCMB 281; *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268; *Staphylococcus aureus* CCMB 262, resistente à estreptomicina e diidrostreptomicina; *Staphylococcus aureus* CCMB 263; *Staphylococcus aureus* CCMB 285; *Bacillus cereus* CCMB 282; *Candida albicans* CCMB 286; *Candida albicans* CCMB 266 e *Candida parapsilosis* CCMB 288, resistente a anfotericina-B. Os micro-organismos foram cultivados em Ágar Müller-Hinton (AMH), sendo que as bactérias foram incubadas a 37°C por 24 horas, e as leveduras a 28°C por 48 horas.

## 4.3 TESTES ANTIMICROBIANOS

### 4.3.1 TESTE DE DIFUSÃO EM POÇO

As análises para os testes de difusão em poço foram realizadas de acordo com o recomendado pelo CLSI (2003b), com adaptações. A Figura 2 mostra esquematicamente a sequência da técnica da difusão em poço utilizada no presente estudo para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos. Os testes foram realizados em triplicatas.





2A

Preparo da suspensão do micro-organismo-teste.



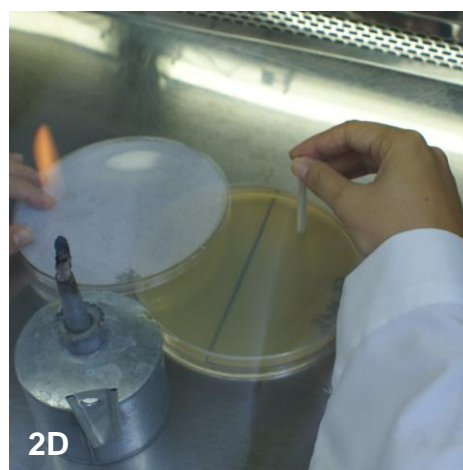
2B

Mistura do meio AMH com a suspensão de micro-organismos.



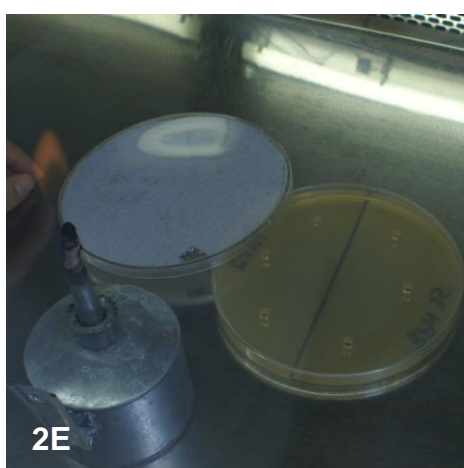
2C

Distribuição do meio AMH em placa de Petri (20x100 mm).



2D

Perfuração de poços de 6,0 mm de diâmetro.



2E

Poços em pontos equidistantes da placa de Petri.



2F

Adição de extratos aos poços

**Figuras 2A-2F.** Esquema do procedimento realizado para detecção da atividade antimicrobiana pelo método da difusão em poço. **Foto:** Gádea (2010).

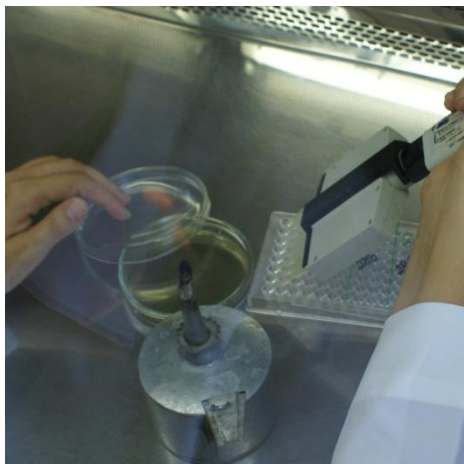
As suspensões de micro-organismos foram obtidas pela adição do inóculo microbiano a 6,0 mL de solução salina a 0,45% esterilizada. A suspensão do micro-organismo teste foi ajustada, 0,1 mL de  $1,5 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup> para bactérias e 0,1 mL de  $1,5 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> para leveduras, utilizando o turbidímetro do equipamento VITEK da Biomérieux, seguindo as instruções do fabricante. Após preparada, a suspensão de micro-organismo foi colocada em um frasco de 250 mL contendo 120 mL de AMH fundido, previamente preparado, possibilitando a homogeneização da mistura. Em placas de Petri (20 x 100 mm) ocorreu a distribuição dessa mistura, após resfriamento, à temperatura ambiente, e solidificação, foram perfurados poços de 6,0 mm de diâmetro em pontos equidistantes no meio de cultivo contido na placa de Petri, e foram inoculados, em cada um deles, 65 µL das amostras de extrato bruto (na concentração de 200 mg/mL) em triplicata. Concomitantemente foram realizados controles positivos para bactérias com adição de Cloranfenicol (30 µg/mL) e para leveduras, Nistatina (10 µg/mL); o controle negativo foi realizado utilizando o Dimetilsulfóxido (DMSO), solvente utilizado para a ressuspensão dos extratos, para a verificação de sua interferência nos resultados. As placas contendo as leveduras foram incubadas a 28°C por 48h e bactérias a 37°C por 24h. Após o período de incubação, mediu-se com uma régua milimetrada, os diâmetros dos halos de inibição quando presentes e foi calculado o desvio padrão das triplicadas.

Como o teste de difusão em ágar é caracterizado como teste qualitativo, realizou-se a Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para resultados quantitativos e também para a comparação dos resultados destes dois métodos.

#### 4.3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Foi utilizado o ensaio de susceptibilidade por microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) recomendada pelo CLSI (2003a) para bactérias e CLSI (2002) para leveduras.

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada utilizando placas de microtitulação, de poliestireno, estéreis, com 96 poços, próprias para microdiluição (Figura 3).



**Figura 3.** Determinação da CIM utilizando-se pipeta automática multicanal.  
**Foto:** Guiutierrez (2010).

O extrato foi dissolvido em DMSO, e água (50:50) para diminuir o potencial inibitório do DMSO e, em seguida, o extrato foi esterilizado por filtração através da membrana de acetato celulose (0,22  $\mu\text{m}$ ).

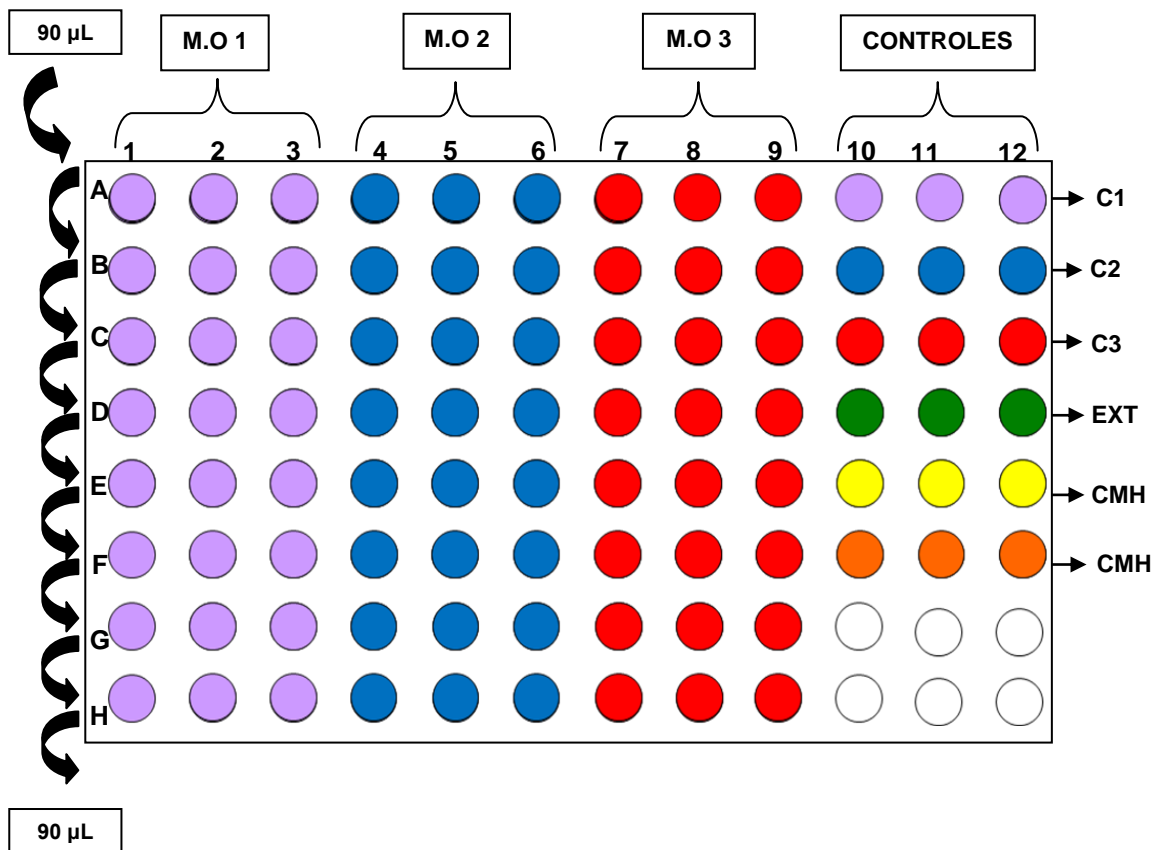
Foram preparadas diluições geométricas na placa, conforme demonstrado na Figura 4, em que foram colocados 90  $\mu\text{L}$  dos extratos diluídos em DMSO+água nos poços das linhas A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8 e A9 da placa de microtitulação, contendo previamente 90  $\mu\text{L}$  de caldo Müller-Hinton duas vezes concentrado. Com isso, os primeiros poços (A1 até A9) continham extratos brutos diluídos na concentração de 10,00  $\text{mg.mL}^{-1}$  até a de 0,078  $\text{mg.mL}^{-1}$  (H1 até H9).

As suspensões de micro-organismos foram obtidas conforme anteriormente descritas para metodologia de difusão em poço. Depois de realizadas as diluições em todos os poços, cada poço recebeu 10  $\mu\text{L}$  da suspensão de micro-organismo teste, totalizando um volume de 100  $\mu\text{L}$  em cada poço (90  $\mu\text{L}$  do CMH + extrato e 10  $\mu\text{L}$  de micro-organismo). As placas foram incubadas à 28°C por 48 horas para as leveduras e à 37°C por 24 horas para as bactérias. Após o período de incubação, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de cloreto 2-3-5 trifênil tetrazólio na concentração final de 1,25  $\text{mg.poço}^{-1}$  (leveduras) e 30  $\mu\text{L}$  de Rezasurina na concentração final de 0,01% (bactérias), para análise quantitativa do crescimento microbiano nos poços de ensaio e determinação da atividade antimicrobiana relativa de cada diluição das amostras. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Diluições do antifúngico nistatina e do antibiótico cloranfenicol, na concentração estoque de 20  $\text{mg.mL}^{-1}$  e 10  $\text{mg.mL}^{-1}$  respectivamente, foram

utilizadas como controles positivos para fins de comparação de dados entre experimentos independentes e como indicadores para avaliação relativa do nível de inibição das amostras testadas. Foram realizados também controles de viabilidade dos micro-organismos testados, da esterilidade do meio de cultura, do extrato e do potencial de inibição do DMSO sobre os micro-organismos testados. Neste trabalho foi considerado como resultados representativos de CIM valores iguais ou inferiores a  $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  do extrato testado.

Visando comparar os resultados dos dois ensaios de difusão e diluição, após a determinação da CIM foi determinada, em porcentagem, a quantidade de extratos que inibiram cada micro-organismo na difusão em poço e na CIM.



**Figura 4.** Esquema da placa de 96 poços para a determinação da CIM. C1; C2 e C3: Controle dos micro-organismos; EXT.: Controle do extrato CMH: Controle do meio de cultura 1x e 2x concentrados, respectivamente; M.O: Microrganismo.

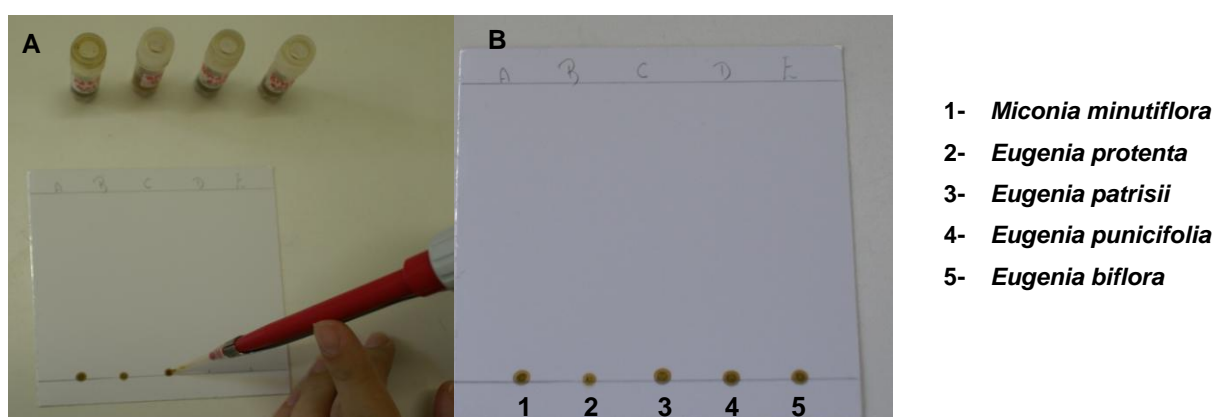
#### 4.3.3 CONCENTRAÇÃO MICROBICIDA MÍNIMA (CMM)

Após a determinação da CIM, realizou-se a concentração microbicida mínima (CMM). Para isso, utilizaram-se placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton (AMH). Das amostras que apresentaram resultado positivo no CIM foram retiradas alíquotas de 5 µL dos poços e plaqueadas sobre AMH. As placas de AMH contendo as leveduras foram incubadas a 28°C por 48h e bactérias a 37°C por 24h. A CMM foi considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento celular sobre a superfície do AMH.

#### 4.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA

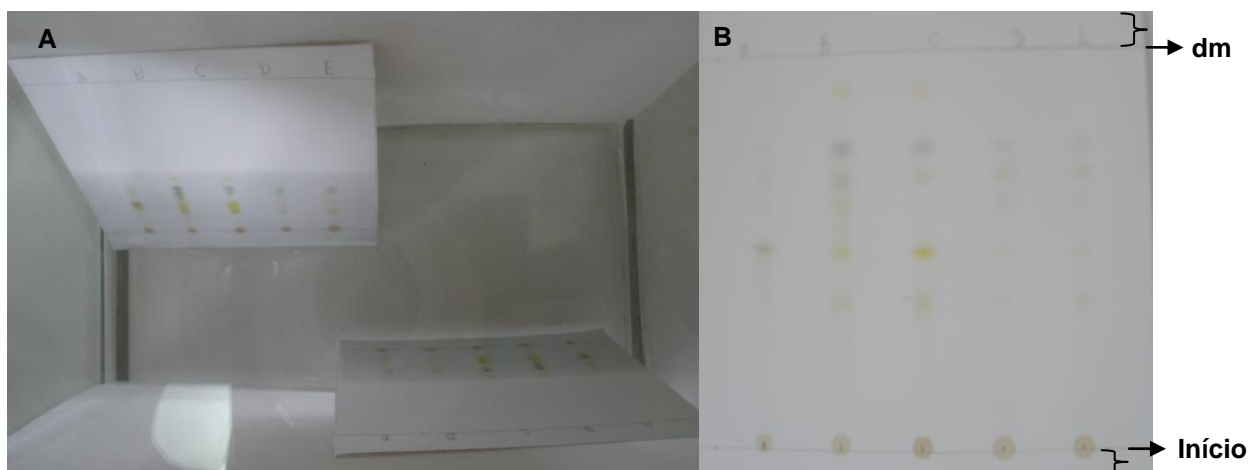
A cromatografia em camada delgada (CCD) foi a metodologia utilizada para realização da triagem fitoquímica dos metabólicos encontrados nos extratos.

Inicialmente 3,0 mg do extrato foram dissolvidos em 1,0 mL de metanol. Em seguida, com auxílio de uma micropipeta, foram aplicados 1,5 µL de extrato em placas cromatográficas de 10 X 10cm, com base de alumínio revestidas com sílica gel 60 com indicador de fluorescência (Modelo Alugram Sil G / UV 254 – Marca Macherey-Nagel) que haviam sido previamente ativadas em estufa a 120°C por meia hora. As amostras foram aplicadas seguindo sempre a mesma sequência de aplicação em relação às espécies de origem dos extratos (Figuras 5A e 5B).



**Figura 5:** (A) Aplicação dos extratos em placas de sílica gel (10 cm<sup>2</sup>) para eluição em sistemas de solventes. (B) Foto de amostras de extrato bruto aplicadas em placa de sílica gel para desenvolvimento da Cromatografia em Camada Delgada (CCD). **Foto:** Guiutierrez (2010).

Foram realizados diversos testes preliminares com objetivo de definir o melhor sistema de solvente que separaria as amostras. Depois desta definição, as placas foram eluídas em cubas cromatográficas e os seguintes sistemas de solventes foram utilizados como eluentes: hexano: diclorometano: acetato de etila: ácido acético (40:40:20:0,5 v/v) para todos os extratos (Figura 6A).



**Figura 6:** (A) Eluição das amostras dos extratos, no sistema hexano: diclorometano: acetato de etila: ácido acético (40:40:20:0,5 v/v). (B) Placa de sílica com as amostras após serem eluídas. Foto: Autora (2010).

Após eluição, as placas foram secas (Figura 6B), visualizadas em luz UV254 nm e 365 nm e, posteriormente, reveladas com Reagente Anisaldeído Ácido Sulfúrico (AS), Reagente Dragendorff com Ácido Clorídrico (DRG), Reagente LiebermannBurchard (LB), Reagente Hidróxido de Potássio (KOH) e Reagente Polietilenoglicol (NP/PEG), conforme metodologia descrita por Wagner e Bladt (1995). A coloração observada nas cromatoplasmas foi comparada com as figuras presentes no Atlas de Wagner e Bladt (1995). Os fatores de retenção foram determinados através da expressão:

$$RF = d_r/d_m$$

Em que:  $d_r$ = distância (cm, mm) percorrida pela substância (Figura 6b);

$d_m$ = distância (cm, mm) percorrida pela frente da fase móvel (Figura 6b).

#### 4.4.1 REAGENTE ANISALDEÍDO - ÁCIDO SULFÚRICO (AS)

Para o preparo deste reagente, foi misturado 0,5 mL de anisaldeído com 10 mL de ácido acético glacial, seguido de 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem. As placas foram borrifadas com cerca de 10 mL desta solução, aquecidos a 100°C por 5 a 10 min, e então foram observados à luz visível ou UV 365 nm.

#### 4.4.2 REAGENTE DRAGENDORF COM ÁCIDO CLORÍDRICO (DRG)

Foram preparadas as soluções A e B. Para preparo da solução A, 0,85 g de nitrato de bismuto básico foi dissolvido em 10 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água sob aquecimento. Para a solução B, 8 g de iodeto de potássio foram dissolvidos em 30 mL de água. Para borrifar nas cromatoplasmas, misturou-se então as duas soluções na proporção de 1:1 (v:v), e acrescentou-se 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água. As placas foram borrifadas com cerca de 10 mL desta solução e então foi observado à luz visível.

#### 4.4.3 REAGENTE LIEBERMANN-BURCHARD (LB)

Foram misturados 5 mL de anidrido acético com 5 mL de ácido sulfúrico, e adicionados cuidadosamente a 50 mL de etanol absoluto, previamente em banho de gelo. As placas foram borrifadas com cerca de 10 mL desta solução, aquecidos a 100°C durante 5 a 10 min., e então foram observados à luz UV 365 nm.

#### 4.4.4 REAGENTE HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO (KOH)

Foi preparada uma solução etanólica a 5% de hidróxido de potássio. Este reagente foi borrifado nas placas, e estas foram observadas à luz visível ou UV 365 nm (com ou sem aquecimento).



#### 4.4.5 REAGENTE PRODUTOS NATURAIS POLIETILENOGLICOL (NP/PEG)

Para o preparo desse reagente o éster difenilborato de 2-aminoetil foi solubilizado em metanol a concentração de 1% (NP). Separadamente o polietilenoglicol (PEG)-400 foi dissolvido em etanol a uma concentração de 5%. Após eluição, as cromatoplasmas foram borrifadas com um pulverizador de vidro que continha inicialmente cerca de 10 mL da solução NP, acoplado a um compressor para aspersão de volume suficiente para recobrimento da placa: em seguida, as placas foram borrifadas pelo mesmo sistema com cerca de 10 mL da solução PEG, sendo então observadas a luz UV 365 nm.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO TESTE DE DIFUSÃO EM POÇO.

Os extratos brutos foram testados contra dez micro-organismos entre Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras. Os resultados estão resumidos na Tabela 4.

Dos 37 extratos preparados para serem utilizados na pesquisa, 29 foram utilizados para a realização do teste em poço, uma vez que os 8 extratos pertencentes as espécies *Cyperus giganteus*, *Cyperus articulatus*, *Mansoa difficilis* e *Croton pullei* não possuíam massa suficiente para o referido teste.

**Tabela 4.** Média dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano pelo teste de difusão em poço, em mm, dos extratos, metanólicos e hexânicos, de plantas aromáticas do Pará contra os micro-organismos teste.

DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO (mm) DOS EXTRATOS DE PLANTAS AROMÁTICAS DO PARÁ																
MICROORGANISMOS	<i>Ocotea longifolia</i>	<i>Miconia minutiflora</i>	<i>Aparisthium cordatum</i>	<i>Eugenia patrisii</i>	<i>Rollinia exsucca</i>	<i>Probitum heptaphyllum</i>	<i>Esenbeckia almawilla</i>	<i>Eugenia patrisii</i>	<i>Eugenia biflora</i>	<i>Eugenia puniceifolia</i>	<i>Annona densicoma</i>	<i>Eugenia biflora</i>	<i>Siparuna guianensis</i>	<i>Ertela triflora</i>	Cloranfenicol/ Nistatina	DMSO
	F/CF	Folha	F/CF	Folha	Folha	Caule fino	Folha	F/CF	Folha	Folha	Folha	Folha	F/CF	PI		
	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	Hexano	MeOH	MeOH		
<i>E. coli</i> CCMB 261	0	18,5 ± 0,4	10 ± 0	11,5 ± 1	0	11 ± 0,4	0	15,4 ± 0,2	12,2 ± 0,6	16,2 ± 0,2	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> CCMB 268	0	16,8 ± 0,1	15,5 ± 0,4	12,5 ± 0,7	0	10 ± 0,4	0	16 ± 0,4	12,5 ± 0,7	20,8 ± 0,9	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> sp. CCMB 281	0	20,8 ± 0,6	15,7 ± 0,2	17 ± 0,7	0	17,7 ± 0,6	0	18,7 ± 1,1	15 ± 0	16,7 ± 0,2	14,5 ± 0,4	7,8 ± 0,2	0	0	29,8 ± 1	0
<i>S. aureus</i> CCMB 262	0	18,5 ± 0,7	13,7 ± 0,9	14,7 ± 0,24	13,2 ± 0,6	15,5 ± 1,5	11,4 ± 0,5	17,2 ± 0,2	15,2 ± 0,2	17 ± 0	0	9,2 ± 0,6	0	0	23,3 ± 0,8	0
<i>S. aureus</i> CCMB 263	0	21,7 ± 0,9	15,8 ± 0,8	18,23 ± 0,5	13,2 ± 0,6	23,8 ± 0,2	0	18,4 ± 0,2	16,9 ± 0,2	18,2 ± 1,2	0	8,5 ± 0,7	0	0	30 ± 0,4	0
<i>S. aureus</i> CCMB 285	0	19,7 ± 0,5	10 ± 0,4	16,3 ± 0,5	10,3 ± 0,5	22,5 ± 1	0	16,4 ± 0,2	14,2 ± 0,2	16,3 ± 0,2	0	8,7 ± 0,2	0	0	29,2 ± 0,9	0
<i>B. cereus</i> CCMB 282	0	18,3 ± 0,2	14 ± 0,7	15 ± 0	12,2 ± 0,2	13,2 ± 0,2	0	15,4 ± 0,2	14,7 ± 0,6	16 ± 0,4	0	9,3 ± 0,6	0	0	26,2 ± 1,6	0
<i>C. albicans</i> CCMB 286	0	19,8 ± 1	16,7 ± 0,5	11,5 ± 0,4	0	14,2 ± 0,2	0	15,7 ± 0,9	12,9 ± 0,2	13,8 ± 0,2	0	8,8 ± 0,5	0	0	17,8 ± 0,5	0
<i>C. albicans</i> CCMB 266	0	17,7 ± 1,3	13,3 ± 0,4	0	0	0	0	15,7 ± 0,5	12,5 ± 0,4	13,3 ± 0,2	0	9,3 ± 0,6	0	0	18,5 ± 0	0
<i>C. parapsilosis</i> CCMB 288	0	20,3 ± 0,9	0	15,3 ± 0,2	0	0	0	12 ± 0,4	15 ± 1,1	15,8 ± 0,9	0	7,7 ± 0,5	0	0	0	0

(F/CF) folhas e caules finos; (PI) Planta inteira; (PA) Parte aérea; (MeOH) metanólico.

**Tabela 4.** (continuação) Média dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano pelo teste de difusão em poço, em mm, dos extratos, metanólicos e hexanólicos, de plantas aromáticas do Pará contra os micro-organismos teste.

DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO (mm) DOS EXTRATOS DE PLANTAS AROMÁTICAS DO PARÁ																	
MICRO-ORGANISMOS	<i>Duguetia riparia</i>	<i>Duguetia echinophora</i>	<i>Croton tinitatis</i>	<i>Annona paludosa</i>	<i>Myrcia cf. sylvatica</i>	<i>Cassipouira americana</i>	<i>Myrcia rufipila</i>	<i>Mansoa difficilis</i>	<i>Eugenia protota</i>	<i>Centratherum punctatum</i>	<i>Wedelia paludosa</i>	<i>Piper tuberculatum</i>	<i>Calycolpus goetheanus</i>	<i>Hyptis suaveolens</i>	<i>Hedychium coronarium</i>	Cloranfenicol/ Nistatina	DMSO
	Folha	Folha	Folha	Folha	Folha	PI	Folha	Folha	Folha	PA	Folha	Folha	Folha	PA	Caule		
	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	Hexano	Hexano	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	Hexano	MeOH	Hexano	MeOH	MeOH		
<i>E. coli</i> CCMB 261	0	0	0	0	0	0	14,8 ± 0,8	0	14,8 ± 0,6	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> CCMB 268	0	0	0	0	0	0	8 ± 0	0	11,3 ± 0,2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella sp.</i> CCMB 281	0	0	0	0	0	0	16,2 ± 0,2	0	13,7 ± 0,2	0	0	0	0	0	0	29,8 ± 1	0
<i>S. aureus</i> CCMB 262	0	0	0	12,2 ± 0,2	0	10 ± 0	15,5 ± 0,4	0	19 ± 0	31,8 ± 0,9	10,3 ± 0,5	12,2 ± 1,5	12,2 ± 1,5	0	0	23,3 ± 0,8	0
<i>S. aureus</i> CCMB 263	0	0	0	12,3 ± 0,2	0	0	18,7 ± 0,5	0	18,7 ± 0,6	35,3 ± 0,5	9,2 ± 0,5	0	0	0	0	30 ± 0,4	0
<i>S. aureus</i> CCMB 285	0	0	0	11,5 ± 0,8	6 ± 0	10,3 ± 0,5	14,7 ± 1,3	0	15,7 ± 0,2	28,5 ± 0,8	0	0	0	0	0	29,2 ± 0,9	0
<i>B. cereus</i> CCMB 282	0	0	0	15,7 ± 0,2	0	0	16,7 ± 0,2	0	14,3 ± 0,6	26,5 ± 0,8	10,8 ± 0,6	10 ± 0	10 ± 0	0	0	26,2 ± 1,6	0
<i>C. albicans</i> CCMB 286	19,2 ± 0,2	0	0	0	0	0	14,3 ± 0,5	0	17,7 ± 0,2	0	0	13,2 ± 0,5	13,2 ± 0,5	0	0	17,8 ± 0,5	0
<i>C. albicans</i> CCMB 266	12,5 ± 0,8	0	0	11,8 ± 0,6	0	0	12,2 ± 0,9	0	15,3 ± 1	0	0	0	0	0	0	18,5 ± 0	0
<i>C. parapsilosis</i> CCMB 288	0	0	0	12,2 ± 0,2	0	0	14,7 ± 0,2	0	15 ± 0,4	0	0	0	0	0	0	0	0

(F/CF) folhas e caules finos; (PI) Planta inteira; (PA) Parte aérea; (MeOH) metanólico.

Os micro-organismos utilizados nos experimentos de avaliação da atividade antimicrobiana foram escolhidos por serem as bactérias e fungos empregados rotineiramente para esse tipo de estudo, sendo também responsáveis por várias formas de infecções em humanos e adquirirem, com mais frequência, resistência aos antimicrobianos (OPLUSTIL et al., 2000).

Dentre todos os extratos, dois eram da espécie *Eugenia patrisii* (um originado a partir de folhas e outro a partir de folhas e caules finos, ambos metanólicos) e, outros dois das folhas de *Eugenia biflora* (um metanólico e outro hexanólico) (Tabela 3). A verificação da atividade antimicrobiana a partir destes extratos foi interessante, pois, foi observado que apesar de pertencerem à mesma espécie eles apresentaram diferenças no nível de inibição (Tabela 4). O extrato metanólico de *Eugenia biflora* apresentou halos significativamente maiores em relação ao extrato hexânico da mesma espécie e inibiu um maior número de micro-organismos. Este fato está provavelmente relacionado à diferença nas polaridades dos solventes, cujo intuito é de localizar princípios ativos que apresentem efeitos biológicos de interesse (CHECHINEL-FILHO; YUNES, 1998). O fato das amostras serem colhidas em localidades diferentes, ecossistemas diferentes, também contribui para diferença na resposta biológica, pois segundo Nascimento et al., (2008) o fato de estas plantas estarem submetidas a diferentes condições climáticas, contribui para diferenças qualitativa e quantitativa na produção de metabólitos secundários.

Celotto et al. (2003), avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólico, hexânico e diclorometânico de *Miconia rubiginosa* (Blalp.) DC. utilizando a técnica do poço, notaram que diferentes resultados foram apresentados. Observaram que o extrato etanólico em uma concentração de 300 mg/mL foi o mais ativo, inibindo a bactéria Gram-positiva *S. aureus*.

Os extratos de *Eugenia patrisii*, ambos metanólicos, porém um preparado a partir de folhas e galhos finos e o outro apenas com as folhas; apresentaram resultados distintos através desta metodologia. O extrato das folhas e galhos finos demonstrou melhores resultados, uma vez que apresentou maiores halos e inibiu um maior número de micro-organismos (Tabela 4). Segundo Cechinel-Filho e Yunes (1988) a constituição química, na maioria dos casos, difere significativamente em relação às distintas partes da planta. Raven, Evert e Curtis (2007) também afirmam que isto pode ocorrer devido aos compostos secundários não estarem

uniformemente distribuídos pela planta, sendo frequentemente sintetizados em uma parte da planta e armazenados em outra.

Dos os 29 extratos testados pela metodologia de difusão em ágar, 21 (72,4%) demonstraram atividade antimicrobiana positiva contra, pelo menos, um micro-organismo, enquanto 6 (20,7%) extratos pertencentes às espécies *Myrcia rufipila*, *Eugenia protenta*, *Eugenia patrisii* (folhas/caules finos), *Eugenia puniceifolia*, *Eugenia biflora* (metanólico) e *Miconia minutiflora* apresentaram atividade antimicrobiana positiva para 100% dos micro-organismos testados, com menor e maior halo de inibição entre 8 e 21,7 mm.

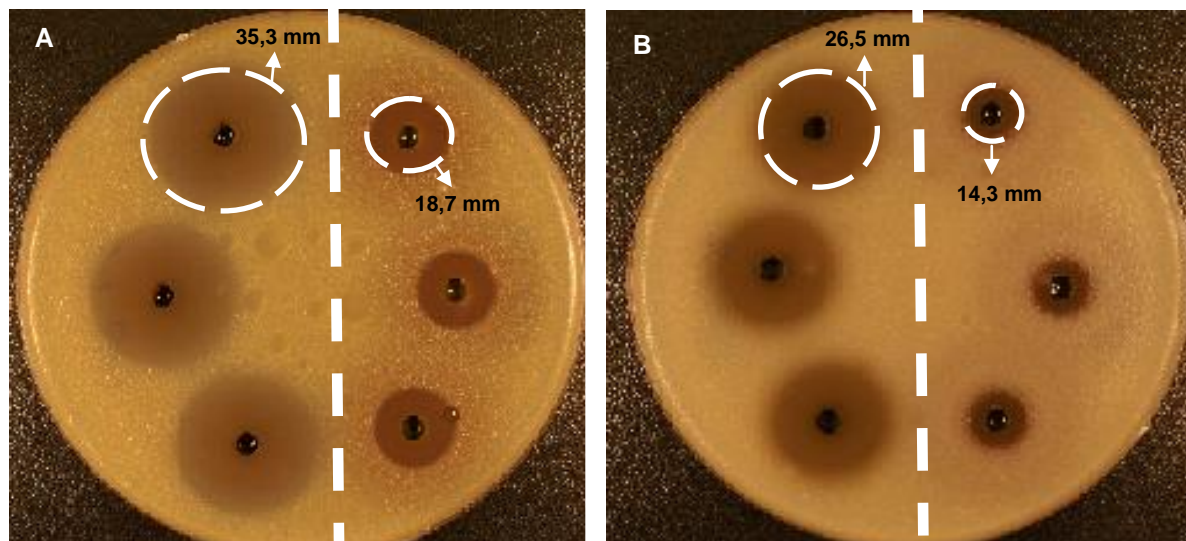
Dos 29 extratos utilizados no teste, 13 (44,8%) inibiram todas as bactérias Gram-positivas. Nesta pesquisa, o extrato metanólico que apresentou o melhor resultado para bactérias *Staphylococcus aureus* foi o de *Centratherum punctatum*, com halos de inibição variando entre 28,5 e 35,3 mm de diâmetro (figura 7), porém além deste, outros 13 (44,8%) extratos tiveram a capacidade de inibir este micro-organismo e 19 (65,5%) inibiram pelo menos uma delas. Estes resultados apontam elevado potencial antimicrobiano dos extratos testados no presente estudo. A cepa de *S. aureus* CCMB 262 foi a mais suscetível, sendo inibida por 18 (62%) extratos testados. Com relação à bactéria *B. cereus* CCMB 282, 16 (55%) dos extratos foram capazes de inibir esta bactéria, o extrato da espécie *Centratherum punctatum* foi o que apresentou melhor resultado, com halo médio de 26 mm. Os halos de inibição apresentados por essa espécie foram excelentes quando comparados com outros halos do teste em difusão em poço demonstrado na literatura (MAHESH; SATISH, 2008; SALVAGININI et al., 2008; SILVEIRA et al, 2009). Este extrato demonstrou grande capacidade de inibição em bactérias Gram-positivas, como demonstrado nas Figuras 7A e 7B e Tabelas 4.

*Centratherum punctatum* pertence à família Asteraceae. As espécies da família Asteraceae são muito estudadas quanto à sua composição química e atividade biológica, pois apresentam poliacetilenos, lactonas sesquiterpênicas (LSTs), óleos essenciais, terpenóides, alcalóides, látex com triterpenos, saponinas triterpenóides pentacíclicas, antocianinas e flavonóides (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). As LSTs são consideradas marcadores químicos da família Asteraceae, de onde a grande maioria de substâncias com enorme variedade estrutural já foi isolada, além disso, possuem diversas atividades biológicas: antimicrobiana, antitumoral e anti-inflamatória (RIVERO et al., 2002; BARATTO et

al., 2008; KAMBIJ; SALUJA, 2008; BATISCH et al., 2009). Este é o primeiro trabalho na literatura científica que evidencia a atividade antimicrobiana de *Centratherum punctatum*, sendo que os resultados do presente estudo demonstram o potencial desta espécie para o estudo e desenvolvimento de drogas para o controle da *S. aureus* e *B. cereus*.

A busca por novos agentes antimicrobianos no controle da *Staphylococcus aureus* é importante, uma vez que este micro-organismo constitui-se como um importante patógeno devido à sua virulência, resistência aos antimicrobianos e associação a várias doenças, incluindo enfermidades sistêmicas potencialmente fatais, infecções cutâneas, infecções oportunistas e intoxicação alimentar (LOWY, 1998; ARDURA, 2009). *Bacillus cereus* está entre as predominantes em surtos de intoxicação alimentar, causando diarreia sendo estas alterações atribuídas à ação das enterotoxinas e de uma potente toxina emética (GOMES, 2004).

Pesquisa realizada por Sader et al. (2001), mostraram que os patógenos mais frequentemente isolados em alguns hospitais brasileiros foram *Staphylococcus aureus* (22,8%), seguidos pela *Escherichia coli* (13,8%) e a *Pseudomonas aeruginosa* (13,3%). As infecções fúngicas, tornaram-se também importantes causas de infecções hospitalares, principalmente em pacientes imunocomprometidos, ou também por outros fatores predisponentes (MIRANDA et al., 2003). Logo, a busca de propriedades antibacterianas em extratos de plantas e de substâncias mais específicas tem sido incentivada e intensificada (MIGUEL; MIGUEL, 1999; RIOS; RECIO, 2005; BARREIRO; BOLZANI, 2009).



**FIGURA 7.** Placas do teste de difusão em poço, após período de incubação, dos extratos metanólicos de *Centratherum punctatum* (lado esquerdo das placas) e *Eugenia protenta* (lado direito das placas) contra *S. aureus* CCMB 263 (A) e contra *Bacillus cereus* CCMB 282 (B). **Foto:** Vasconcellos- Neto (2010).

Dentre os 29 extratos utilizados no teste, 9 (31%) inibiram todas as bactérias Gram-negativas, sendo que a *Salmonella* sp. CCMB 281, importante agente causador de infecção alimentar (SHINOHARA et al., 2008), foi sensível a 11 (38%) dos extratos testados. *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* também foram sensíveis a 9 (31%) dos extratos testados. As leveduras foram inibidas por 7 (24%) dos extratos testados, sendo que 14 (48%) deles inibiram pelo menos uma das leveduras.

O extrato da *Miconia minutiflora* apresentou melhor atividade antimicrobiana contra as leveduras testadas. A levedura *C. albicans* CCMB 286 foi mais sensível, frente aos extratos testados (Tabelas 4).

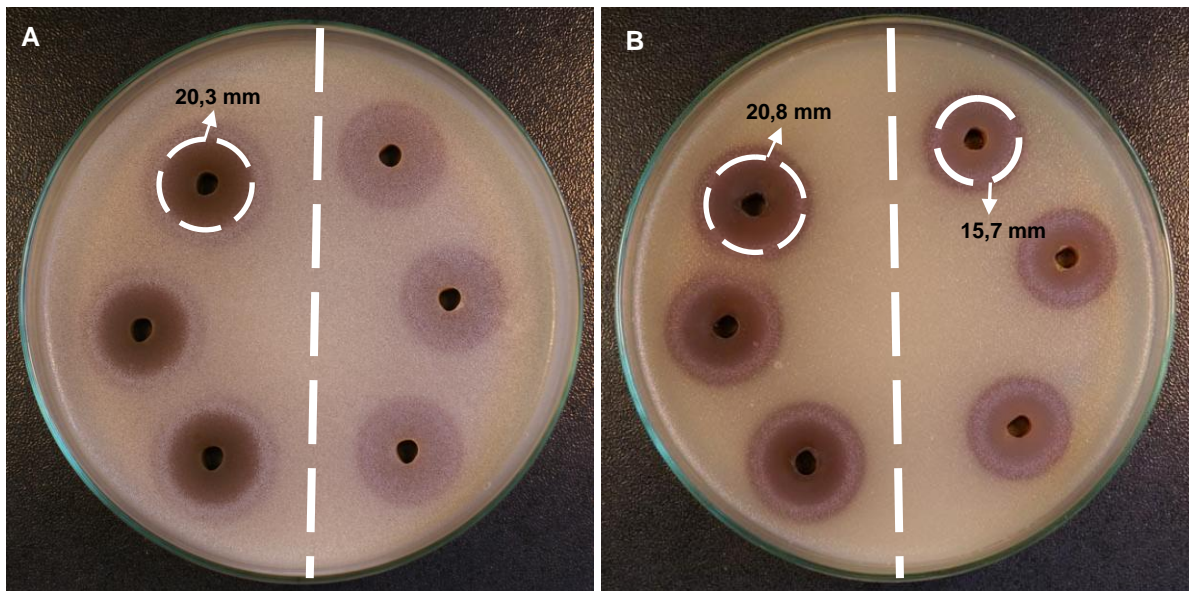
Os diâmetros dos halos de inibição apresentados pelo extrato metanólico de *Miconia minutiflora* nesta pesquisa variaram entre 16,8 mm e 21,7 mm (Figura 8A e 8B), apresentando resultados superiores em relação a outros trabalhos semelhantes encontrados na literatura.

Através de experimentos com extratos etanólico e diclorometânico de *Miconia rubiginosa*, Alves et al. (2008) demonstraram, pelo teste de difusão em poço, que houve formação de halos de inibição com diâmetros entre 10 mm e 19 mm, contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Estudos realizados por Rodrigues (2007) apresentaram atividade antimicrobiana positiva, com halos de diâmetro médios de 9 mm, contra *Staphylococcus epidermidis*,



*Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* utilizando extratos metanólicos de *Miconia rubiginosa*.

Estudos realizados por Salvaginini et al. (2008) demonstraram a avaliação da atividade antimicrobiana, através da difusão em poço, do extrato etanólico obtido a partir de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) contra as linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Serratia marcescens*, tendo sido observada inibição contra *S. aureus*, *S. epidermidis* e *B. subtilis* com halos de inibição de aproximadamente 14 mm de diâmetro.



**FIGURA 8.** Placas do teste de difusão em poço, após período de incubação, dos extratos metanólicos de *Miconia minutiflora* (lado esquerdo da placa) e *Aparisthium cordatum* (lado direito da placa) contra *Candida parapsilosis* CCMB 288 (A) e *Salmonella* sp. CCMB 281 (B). **Foto:** Vasconcellos- Neto (2010).

Ao observar as Tabelas 4 nota-se que, dentre os três tipos de microrganismos envolvidos (leveduras, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas), em geral, as bactérias Gram-positivas apresentaram-se mais sensíveis aos extratos testados. Esta diferença na sensibilidade entre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas pode estar relacionada à diferença na constituição morfológica destes microrganismos. As bactérias Gram-negativas são citadas por possuírem resistência a muitos dos antibióticos comercializados, sendo a *E. coli* a mais proeminente. A complexidade das bactérias Gram-negativas as torna menos suscetíveis aos agentes antimicrobianos (TADEG et al., 2005).

Em trabalhos realizados por Silva et al., (2010) utilizando extrato metanólico da raiz de *Zanthoxylum stelligerum* Turcz. (Rutaceae) foi verificado que as bactérias Gram-positivas também demonstraram maior sensibilidade, aos extratos, quando comparadas às bactérias Gram-negativas.

Segundo Cressey (2010), grande parte dos ferimentos, causados durante o terremoto no Haiti, tratados em hospital de campanha naquele país, foram infectados com patógenos Gram-negativos, sendo que do total de 46 feridas analisadas, 77% continham vários tipos de micro-organismos e 89% formado por patógenos Gram-negativos que foram, na maior parte, resistentes aos antimicrobianos. Conforme Madigan et al., (2010) as bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, geralmente são mais sensíveis aos antibióticos que bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, embora alguns antibióticos atuem apenas em bactérias Gram-negativas.

A baixa atividade do extrato frente às leveduras pode estar associada à estrutura da sua parede celular, com a presença da quitina e 1,3- $\beta$ -glicano em sua morfologia, o que pode ter dificultado a penetração do agente antimicrobiano. Todos os sistemas enzimáticos que fazem parte da síntese e montagem da parede celular fúngica se transformam em alvo útil para o descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos com maior especificidade (SELITRENNIKOFF, 2001). Segundo Zacchino et al. (2001), é difícil encontrar alvos que ofereçam a seletividade desejada para obter-se um antifúngico seguro, pois as células fúngicas apresentam muitas semelhanças com as células humanas, compartilhando a maioria das vias de metabolismo intermediário e utilizando enzimas muito similares.

O método de difusão em ágar, apesar de sofrer influência de algumas variáveis como: composição do meio de cultura, presença de enzimas, densidade do inóculo, difusibilidade do extrato no meio de cultura, pois é possível que a baixa polaridade dos compostos diminua a velocidade de difusão destes no ágar, gerando um halo de difusão proporcionalmente menor em relação a substâncias mais apolares, conforme Virtuoso et al. (2005), este se constitui como um método preliminar eficiente para a realização de testes de atividade antimicrobiana com extratos vegetais.

O DMSO é uma substância que facilita a difusão (VIEIRA, 2005), mas foi necessário realizar o controle do solvente, uma vez que este pode potencializar a atividade do agente antimicrobiano (HERSCHLER, 1970; RIBEIRO; CARVALHO-

FILHO; LISTONI, 2001). O solvente DMSO utilizado como controle não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana frente a qualquer micro-organismo testado pela metodologia da difusão em poço, enquanto o cloranfenicol e a nistatina, utilizados como controles positivos apresentaram halos de inibição frente a alguns micro-organismos sensíveis (Tabela 4).

Os extratos que não apresentaram atividade contra nenhum dos micro-organismos testados foram: *Ocotea longifolia*, *Siparuna guianensis*, *Ertela trifolia*, *Duguetia echinophora*, *Croton trinitatis*, *Mansoa difficilis*, *Hyptis suaveolens* e *Hedychium coronarium*. Porém, é importante salientar que mesmo com a ausência de halo de inibição, não pode ser descartada a possibilidade da presença de substâncias antimicrobianas em outras partes da planta e mesmo com a ausência de halo de inibição, não pode ser descartada a possibilidade da presença de substâncias antimicrobianas nestes extratos, pois moléculas de maior massa molecular difundem-se no meio com menor velocidade (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988; VIRTUOSO et al., 2005; VALGAS et al., 2007).

Como a técnica de difusão em ágar é um teste qualitativo baseada na difusão das amostras pelo ágar para que estes exerçam a ação, a falta de atividade antimicrobiana pode ser atribuída à falta de difusibilidade dos extratos. Dessa forma, para evitar essa atribuição, foi realizada a técnica de microdiluição da concentração inibitória mínima (CIM) que consiste em um teste quantitativo.

## 5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO MICROBICIDA MÍNIMA (CMM)

A técnica de diluição para determinação de concentrações inibitórias mínimas (CIM) junto com outros sistemas de diluição de antibióticos é considerada, frequentemente, como a melhor metodologia para a avaliação de suscetibilidade ou de resistência das bactérias aos antimicrobianos (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988; REIS, 2006). A determinação da CIM e Concentração Bactericida Mínima (CMM) (Tabelas 5, 5A, 5B, 5C e 5D) foram realizadas com todos os extratos, com exceção do extrato da *Hedychium coronarium*, devido à pequena quantidade de extrato disponível não foi possível realizar a CIM nem a CMM. Também foi realizado o controle do solvente utilizado (DMSO) que apresentou inibição do crescimento microbiano na diluição correspondente a  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  do extrato. Por isso, foram considerados como resultados representativos de CIM valores iguais ou inferiores à próxima menor diluição do extrato testado:  $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

A revelação dos resultados foi feita com o uso de corantes indicadores de oxirredução como 7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido (Resazurina) e Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTZ), pois estes corantes são úteis para mensurar a viabilidade e proliferação das células (PFALLER; BARRY, 1994; BAKER; TENOVER, 1996; CLSI, 2003a; DUARTE et al., 2005). Foi utilizada a Resazurina para bactérias e o TTZ para leveduras. De acordo com Belotti e Barros e Nero (1999), as células vivas, através de enzimas, reduzem o corante TTZ, incolor, originando o Formazano, que fica acumulado no interior dos grânulos das células, resultando na alteração da coloração do meio para rósea. Já a Resazurina, inicialmente de cor azul, é oxidada na presença de células viáveis à Resofurina, substância de coloração vermelha, facilitando a verificação da presença de crescimento microbiano (STOPPA et al., 2009), como pode ser observado na Figura 9.

Os extratos de *Ocotea longifolia*, *Siparuna guianensis*, *Ertela trifolia*, *Duguetia echinophora*, *Croton trinitatis*, *Mansoa difficilis*, *Hyptis suaveolens* que não apresentarem atividade antimicrobiana pelo teste de difusão em poço (Tabela 4), também foram utilizados para a determinação da CIM e CMM para comparação entre os dois métodos.

**Tabela 5.** Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbica Mínima (CMM), em mg.mL<sup>-1</sup>, dos extratos brutos de plantas aromáticas, separadas por família.

Microrganismos	Annonaceae										Asteraceae			
	<i>Annona densicona</i>		<i>Annona paludosa</i>		<i>Duguetia riparia</i>		<i>Duguetia echinophora</i>		<i>Rollinia exsucca</i>		<i>Wedelia paludosa</i>		<i>Centratherum punctatum</i>	
	Folha/MeOH		Folha/MeOH		Folha/MeOH		Folha/MeOH		Folha/MeOH		Folha/Hexano		Parte aérea/MeOH	
	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
<i>E. coli</i> CCMB 261	5	10	5	10	0,078	0,07	5	-	5	10	5	10	5	10
<i>P. aeruginosa</i> CCMB 268	1,25	5	5	5	5	2,5	5	10	5	10	2,5	5	5	10
<i>Salmonella</i> sp. CCMB 281	2,5	10	5	5	5	10	2,5	-	5	10	2,5	10	5	10
<i>S. aureus</i> CCMB 262	0,312	10	5	10	2,5	2,5	5	10	5	10	0,078	0,62	0,156	0,62
<i>S. aureus</i> CCMB 263	0,625	10	5	5	2,5	5	2,5	-	5	10	0,625	1,25	0,156	0,62
<i>S. aureus</i> CCMB 285	2,5	1,25	5	5	5	5	5	5	5	10	2,5	2,5	0,62	0,62
<i>B. cereus</i> CCMB 282	0,625	5	0,312	0,31	2,5	2,5	2,5	5	2,5	5	0,625	1,25	0,312	0,31
<i>C. albicans</i> CCMB 286	2,5	5	1,25	5	1,25	2,5	0,625	5	2,5	5	1,25	2,5	2,5	2,5
<i>C. albicans</i> CCMB 266	2,5	5	1,25	-	1,25	2,5	0,625	10	5	10	1,25	2,5	2,5	2,5
<i>C. parapsilosis</i> CCMB 288	2,5	10	1,25	10	1,25	2,5	0,625	10	5	10	2,5	2,5	2,5	2,5

(-) Não apresentou atividade microbica, (MeOH)= metanol; (F-CF)= folhas e caules finos; (PI)= planta inteira.

**Tabela 5** - Continuação A. Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbica Mínima (CMM), em mg.mL<sup>-1</sup>, dos extratos brutos de plantas aromáticas, separadas por família.

Microrganismos	Burseraceae		Euphorbiaceae								Lamiaceae		Melastomataceae	
	<i>Protium heptaphyllum</i>		<i>Croton trinitatis</i>		<i>Croton pullei</i>		<i>Croton pullei</i>		<i>Aparisthium Cordatum</i>		<i>Hyptis suaveolens</i>		<i>Miconia Minutiflora</i>	
	Caule fino/MeOH		Folha/MeOH		Caule/MeOH		Caule/Hexano		F-CF/MeOH		Parte aérea/MeOH		Folha/MeOH	
	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
<i>E. coli</i> CCMB 261	5	10	5	-	5	5	5	-	1,25	2,5	5	-	0,625	1,25
<i>P. aeruginosa</i> CCMB 268	2,5	1,25	5	10	1,25	2,5	5	10	2,5	2,5	5	-	1,25	2,5
<i>Salmonella</i> sp. CCMB 281	2,5	2,5	5	-	1,25	10	2,5	10	2,5	2,5	5	-	1,25	2,5
<i>S. aureus</i> CCMB 262	2,5	2,5	5	-	0,078	2,5	0,156	5	2,5	5	10	-	0,625	1,25
<i>S. aureus</i> CCMB 263	2,5	2,5	5	-	0,078	5	1,25	10	1,25	2,5	10	-	0,625	1,25
<i>S. aureus</i> CCMB 285	2,5	1,25	10	-	2,5	5	10	10	2,5	5	10	-	0,625	1,25
<i>B. cereus</i> CCMB 282	1,25	1,25	5	5	1,25	1,25	2,5	2,5	5	5	5	-	0,625	1,25
<i>C. albicans</i> CCMB 286	2,5	5	1,25	10	2,5	5	2,5	5	2,5	5	5	10	2,5	5
<i>C. albicans</i> CCMB 266	2,5	5	1,25	10	2,5	5	2,5	10	5	10	2,5	10	2,5	5
<i>C. parapsilosis</i> CCMB 288	2,5	5	1,25	10	2,5	10	2,5	10	5	5	5	10	5	10

(-) Não apresentou atividade microbica, (MeOH)= metanol; (F-CF)= folhas e caules finos; (PI)= planta inteira.

**Tabela 5** – Continuação B. Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbica Mínima (CMM), em mg.mL<sup>-1</sup>, dos extratos brutos de plantas aromáticas, separadas por família.

Microrganismos	Cyperaceae								Monimiaceae		Bignoniaceae					
	<i>Cyperus giganteus</i>		<i>Cyperus giganteus</i>		<i>Cyperus articulatus</i>		<i>Cyperus articulatus</i>		<i>Siparuna guianensis</i>		<i>Mansoa difficilis</i>		<i>Mansoa difficilis</i>		<i>Mansoa difficilis</i>	
	Rizoma/Hexano		Rizoma/MeOH		Tubérculo/MeOH		Tubérculo/Hexano		F-CF/MeOH		Folha/MeOH		Folha/MeOH		Folha/Hexano	
	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
<i>E. coli</i> CCMB 261	5	5	5	-	5	5	5	5	5	-	5	10	2,5	10	5	5
<i>P. aeruginosa</i> CCMB 268	5	-	5	10	0,312	-	5	-	5	10	5	10	2,5	2,5	0,078	10
<i>Salmonella</i> sp. CCMB 281	2,5	5	5	-	2,5	10	2,5	5	2,5	-	5	-	5	10	0,156	10
<i>S. aureus</i> CCMB 262	1,25	5	10	10	0,078	2,5	5	5	5	10	5	10	2,5	5	0,078	10
<i>S. aureus</i> CCMB 263	2,5	5	10	-	2,5	2,5	2,5	5	5	10	5	10	2,5	5	2,5	5
<i>S. aureus</i> CCMB 285	5	10	10	10	5	5	2,5	2,5	10	10	10	-	2,5	2,5	10	-
<i>B. cereus</i> CCMB 282	2,5	10	5	5	1,25	2,5	2,5	5	5	-	5	-	2,5	5	5	10
<i>C. albicans</i> CCMB 286	2,5	5	2,5	10	2,5	5	2,5	5	2,5	10	1,25	10	1,25	10	2,5	5
<i>C. albicans</i> CCMB 266	0,156	5	2,5	-	2,5	5	1,25	5	2,5	10	1,25	10	1,25	5	2,5	5
<i>C. parapsilosis</i> CCMB 288	2,5	10	5	10	2,5	10	2,5	5	2,5	10	1,25	10	1,25	10	2,5	-

(-) Não apresentou atividade microbica, (MeOH)= metanol; (F-CF)= folhas e caules finos; (PI)= planta inteira.

**Tabela 5** – Continuação C. Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM), em mg.mL<sup>-1</sup>, dos extratos brutos de plantas aromáticas, separadas por família.

Microrganismos	Lauraceae				Piperaceae		Rutaceae				Myrtaceae			
	<i>Cassytha americana</i>		<i>Ocotea longifolia</i>		<i>Piper tuberculatum</i>		<i>Ertela trifolia</i>		<i>Esenbeckia almawillia</i>		<i>Myrcia cf. sylvatica</i>		<i>Myrcia rufipila</i>	
	PI/Hexano		F-CF/MeOH		Folha/MeOH		PI/MeOH		Folha/MeOH		Folha/Hexano		Folha/MeOH	
	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
<i>E. coli</i> CCMB 261	5	-	5	10	2,5	10	5	10	5	-	5	-	5	5
<i>P. aeruginosa</i> CCMB 268	5	10	2,5	10	2,5	2,5	5	-	5	10	5	10	2,5	2,5
<i>Salmonella</i> sp. CCMB 281	1,25	10	2,5	-	2,5	5	0,312	10	2,5	10	2,5	-	2,5	2,5
<i>S. aureus</i> CCMB 262	2,5	5	10	10	5	10	2,5	-	0,312	2,5	5	10	2,5	2,5
<i>S. aureus</i> CCMB 263	5	10	10	-	2,5	5	5	-	2,5	5	5	-	1,25	2,5
<i>S. aureus</i> CCMB 285	10	10	10	10	2,5	10	10	10	5	10	10	-	1,25	2,5
<i>B. cereus</i> CCMB 282	2,5	2,5	2,5	10	5	5	2,5	10	2,5	1,25	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>C. albicans</i> CCMB 286	2,5	5	2,5	10	1,25	2,5	2,5	5	5	5	2,5	5	2,5	2,5
<i>C. albicans</i> CCMB 266	0,625	10	2,5	10	0,625	2,5	1,25	5	2,5	5	1,25	5	1,25	2,5
<i>C. parapsilosis</i> CCMB 288	5	5	2,5	10	1,25	2,5	2,5	5	2,5	10	1,25	10	2,5	2,5

(-) Não apresentou atividade microbicida, (MeOH)= metanol; (F-CF)= folhas e caules finos; (PI)= planta inteira.



**Tabela 5** – Continuação D. Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbica Mínima (CMM), em mg.mL<sup>-1</sup>, dos extratos brutos de plantas aromáticas, separadas por família

Microrganismos	Myrtaceae														NIST. CLOR.	DMSO
	<i>Calycolpus goetheanus</i>		<i>Eugenia patrisii</i>		<i>Eugenia patrisii</i>		<i>Eugenia biflora</i>		<i>Eugenia biflora</i>		<i>Eugenia punicifolia</i>		<i>Eugenia protenta</i>			
	Folha/Hexano		F-CF/MeOH		Folha/MeOH		Folha/MeOH		Folha/Hexano		Folha/MeOH		Folha/MeOH			
	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM		
<i>E. coli</i> CCMB 261	5	-	5	5	5	5	2,5	2,5	5	-	10	10	5	5	R	5
<i>P. aeruginosa</i> CCMB 268	5	10	0,625	1,25	2,5	2,5	0,625	5	5	10	2,5	2,5	0,078	0,07	0,312	5
<i>Salmonella</i> sp. CCMB 281	5	-	5	2,5	2,5	2,5	0,625	10	2,5	-	5	-	2,5	5	0,156	5
<i>S. aureus</i> CCMB 262	5	10	0,312	2,5	0,312	0,62	0,625	2,5	0,625	0,62	0,312	1,25	1,25	2,5	0,312	5
<i>S. aureus</i> CCMB 263	5	10	0,312	1,25	0,312	0,62	0,625	2,5	5	5	0,312	1,25	1,25	2,5	0,312	10
<i>S. aureus</i> CCMB 285	5	10	0,625	2,5	0,625	0,31	1,25	5	1,25	2,5	0,625	2,5	1,25	2,5	R	10
<i>B. cereus</i> CCMB 282	5	10	0,312	2,5	0,156	0,31	0,312	1,25	2,5	5	0,312	0,62	2,5	2,5	0,156	5
<i>C. albicans</i> CCMB 286	5	5	2,5	10	2,5	5	1,25	5	1,25	5	0,625	5	1,25	5	0,625	10
<i>C. albicans</i> CCMB 266	5	10	2,5	10	5	10	2,5	5	1,25	5	0,625	5	1,25	5	0,078	10
<i>C. parapsilosis</i> CCMB 288	5	10	2,5	10	2,5	5	2,5	5	5	5	0,625	10	1,25	5	R	10

(-) Não apresentou atividade microbica; (MeOH)= metanol; (F-CF)= folhas e caules finos; (PI)= planta inteira; NIST.= Nistatina; CLOR.= Cloranfenicol; R= Resistente.

Na caracterização da atividade antimicrobiana em meio líquido, observou-se que todos os extratos brutos testados inibiram, em concentrações variadas, o crescimento microbiano. Observou-se que dos 36 extratos testados 34 (94,4%) apresentaram boa atividade frente a pelo menos dois dos micro-organismos testados. Os extratos de *Calycolpus goetheanus* e *Hyptis suaveolens* apresentaram CIM entre 10 e 5 mg.mL<sup>-1</sup>, como foram considerados representativos valores iguais ou inferiores a 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> estes extratos não foram incluídos dentre aqueles que apresentaram atividade antimicrobiana; porém o fato de não apresentarem atividade antimicrobiana detectável, não significa que estas espécies sejam incapazes de produzir compostos bioativos contra os micro-organismos testados. Segundo Raven, Even e Curtis (2007) os compostos secundários não estão uniformemente distribuídos pela planta sendo frequentemente sintetizados em uma parte da planta e armazenados em outra.

Através da técnica de determinação da CIM, observou-se que alguns extratos apresentaram atividade com mesmo grau de intensidade: os extratos metanólicos de *Miconia minutiflora*, *Eugenia patrisii*, *Eugenia biflora* e *Eugenia protenta* apresentaram atividade antimicrobiana intensa para os três tipos de micro-organismos nos dois testes, embora no teste de difusão em poço as respostas de inibição tenham sido diferenciadas. Existe possibilidade de haver uma relação inversa entre o tamanho do halo de inibição e a concentração inibitória mínima, em que quanto maior o diâmetro do halo menor a concentração inibitória (GALES; REIS; JONES, 2001; MADIGAN et al., 2010).

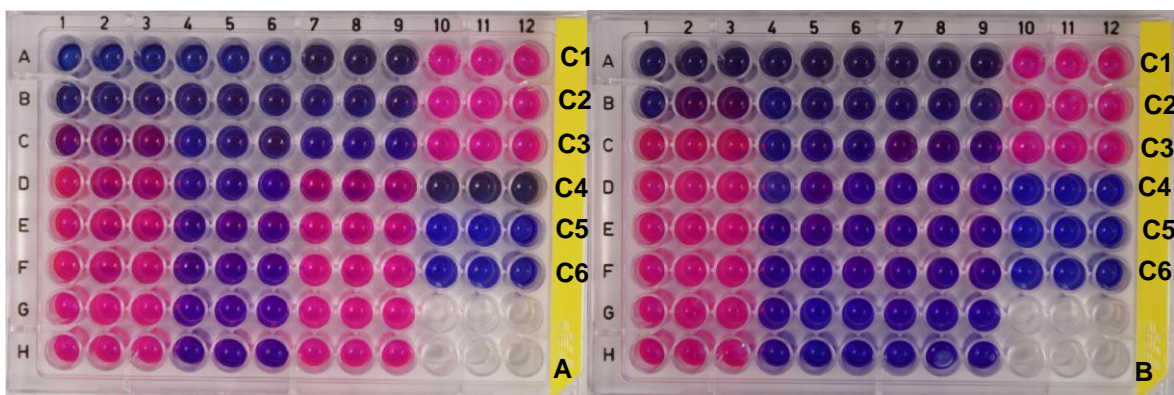
Extratos que não apresentaram atividade antimicrobiana na difusão em poço, apresentaram inibição para alguns micro-organismos através da CIM. Extratos metanólicos de *Duguetia echinophora*, *Duguetia riparia*, e *Croton trinitatis*, e extrato hexânico de *Cassytha americana* (Tabelas 4 e 5). Essa variação pode ser justificada pela composição química das amostras, pois moléculas mais polares ou de maior massa molecular podem ser mais solúveis e de mais fácil dispersão em meio líquido (VALGAS et al., 2007).

Quanto aos microrganismos, dentre as bactérias Gram-positivas, a *Bacillus cereus* CCMB 282 apresentou maior sensibilidade aos extratos através da CIM, sendo

sensível a 27 (75%) extratos, e a melhor inibição foi representada pelo extrato metanólico da folha de *Eugenia patrisii* na concentração de 0,156 mg.mL<sup>-1</sup>.

As cepas *Staphylococcus aureus* CCMB 262 e a *Staphylococcus aureus* CCMB 263 apresentaram a mesma sensibilidade, sendo ambas inibidas por 23 (63,9%) dos extratos testados. A menor concentração para inibir estas espécies chegou a 0,078 mg.mL<sup>-1</sup>. Na concentração de 0,078 mg.mL<sup>-1</sup> a *Staphylococcus aureus* CCMB 262 foi inibida pelos extratos hexânicos de *Wedelia paludosa*, extrato metanólico de *Croton pullei* (Figura 9B), metanólico de *Cyperus articulatus* (Figura 9A) e extrato hexânico de *Mansoa difficilis*. Nesta mesma concentração *Staphylococcus aureus* CCMB 263 foi inibido apenas pelo extrato metanólico de *Croton pullei* (Figura 9B). Estudos realizados por Matias et al. (2010) utilizaram o extrato metanólico bruto das folhas de *Croton campestris* A. St.-Hil. contra *Staphylococcus aureus* e demonstraram que o extrato inibiu este microrganismo em concentrações de até 0,51 mg.mL<sup>-1</sup>.

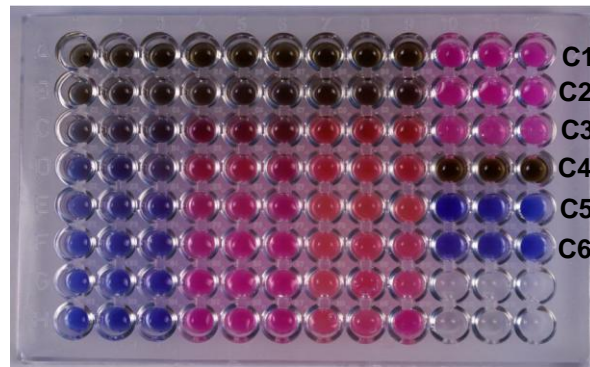
A *Staphylococcus aureus* CCMB 285 apresentou menor sensibilidade, dentre as Gram-positivas, sendo inibida por 17 (47,2%) dos extratos testados, demonstrando inibição em até 0,62 mg.mL<sup>-1</sup> pelos extratos de *Centratherum punctatum*, *Miconia minutiflora*, e pelos dois extratos de *Eugenia patrisii*.



**Figura 09:** Placas de determinação da concentração inibitória mínima. (A) Representação da diluição em série do extrato metanólico bruto do tubérculo de *Cyperus articulatus*: Colunas 1-3 contra *Escherichia coli*, CIM = 5 mg.mL<sup>-1</sup>; Colunas 4-6 contra *Staphylococcus aureus* CCMB 262 - CIM < 0,078 mg.mL<sup>-1</sup> e Colunas 7-9 contra *S. aureus* CCMB 263 - CIM = 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. (B) Extrato metanólico bruto do caule de *Croton pullei*: Colunas 1-3 contra *E. coli*, CIM = 5 mg.mL<sup>-1</sup>; Colunas 4-6 contra *S. aureus* CCMB 262 CIM < 0,078 mg.mL<sup>-1</sup> e Colunas 7-9 contra *S. aureus* CCMB 263 CIM < 0,078 mg.mL<sup>-1</sup>. C1, C2 e C3: controles de crescimento dos micro-organismos-teste; C4: Controle do extrato e C5 e C6: Controle da esterilidade do meio de cultura (CMH).

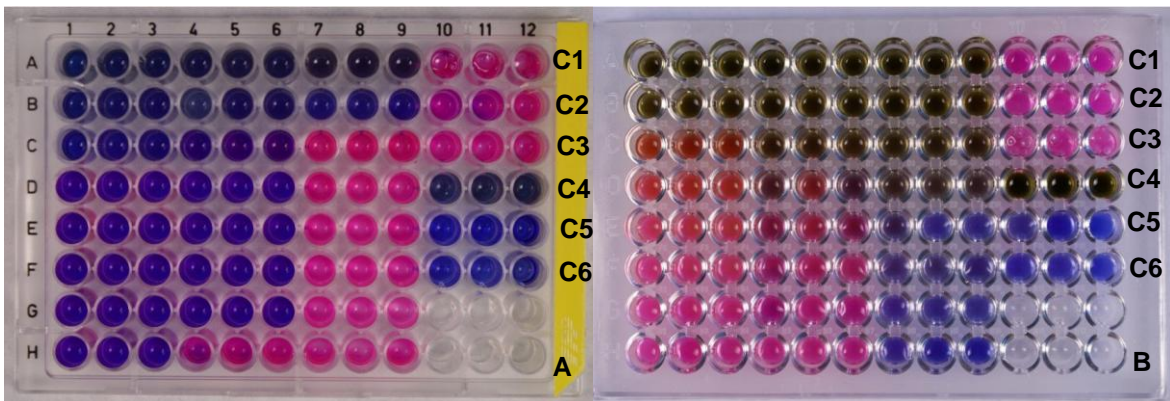
**Foto:** Vasconcellos- Neto (2010).

No caso das bactérias Gram-negativas, as menores CIM para a *E. coli* CCMB 261 foram apresentadas por 6 (16,7%) extratos testados, sendo a menor CIM apresentada pela *Duguetia riparia* inibindo em concentrações de até  $0,078 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Figura 10).



**Figura 10.** Representação da diluição em série do extrato metanólico bruto das folhas de *Duguetia riparia*: Colunas 1-3 contra *Escherichia coli* CCMB 261, CIM <  $0,078 \text{ mg.mL}^{-1}$ ; Colunas 4-6 contra *Staphylococcus aureus* CCMB 263 - CIM =  $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  e Colunas 7-9 contra *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268 CIM =  $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . C1, C2 e C3: controles de crescimento dos micro-organismos-teste; C4: Controle do extrato e C5 e C6: Controle da esterilidade do meio de cultura (CMH). **Foto:** Vasconcellos- Neto (2010).

A *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268 foi inibida significativamente por 17 (47,2%) extratos, sendo a menor CIM demonstrada pelo metanólico de *Eugenia protenta* e hexânico de *Mansoa difficilis*, inibindo em até  $0,078 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Figura 11A e B). A *Salmonella* sp. CCMB 281 foi inibida por 24 (66,7%) extratos, sendo a maior inibição apresentada pelo extrato hexânico de *Mansoa difficilis* (Figura 11A) inibindo em até  $0,156 \text{ mg.mL}^{-1}$ .



**Figura 11:** Placas de determinação da concentração inibitória mínima. (A) Representação da diluição em série do extrato hexânico de *Mansoa difficilis*: Colunas 1-3 contra *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268, CIM < 0,078 mg.mL<sup>-1</sup>; Colunas 4-6 contra *Salmonella* sp. CCMB 281 - CIM < 0,156 mg.mL<sup>-1</sup> e Colunas 7-9 contra *Bacillus cereus* CCMB 282 - CIM = 5 mg.mL<sup>-1</sup>. (B) Extrato metanólico de *Eugenia protenta*: Colunas 1-3 contra *Escherichia coli* CCMB 261, CIM = 5 mg.mL<sup>-1</sup>; Colunas 4-6 contra *Staphylococcus aureus* CCMB 263 - CIM = 1,25 mg.mL<sup>-1</sup> e Colunas 7-9 contra *P. aeruginosa* CCMB 268 - CIM < 0,078 mg.mL<sup>-1</sup>. C1, C2 e C3: controles de crescimento dos micro-organismos-teste; C4: Controle do extrato e C5 e C6: Controle da esterilidade do meio de cultura (CMH). **Foto:** Vasconcellos- Neto (2010).

No teste de difusão em poço o maior halo demonstrado pelas bactérias Gram-negativas apresentou 20,8 mm pelo extrato de *Miconia minutiflora* contra *Salmonella* sp., enquanto que para a Gram-positiva o maior halo foi de 35,3 mm pelo extrato de *Centratherum punctatum* contra *Staphylococcus aureus* CCMB 263. Na CIM as bactérias Gram-positivas, em geral, também exibiram maior sensibilidade do que as bactérias Gram-negativas (Tabelas 5).

Com relação às leveduras foi observado que os extratos apresentaram atividade antimicrobiana em geral duas vezes mais intensa no teste de determinação da CIM em relação ao teste de difusão em poço (Tabela 5). A *Candida albicans* CCMB 266 foi inibida por 32 (88,9%), sendo a maior inibição proporcionada pelo extrato hexânico de *Cyperus giganteus* inibindo em até 0,156 mg.mL<sup>-1</sup>. A *Candida albicans* CCMB 286 foi inibida por 33 (91,7%) extratos, os extratos da *Eugenia punicifolia* e *Duguetia echinophora* demonstraram inibição em até 0,625 mg.mL<sup>-1</sup>. A *Candida parapsilosis* CCMB 288 foi inibida por 28 (77,8%) extratos testados, sendo a *Duguetia echinophora* e a *Eugenia punicifolia* os extratos que expressaram os melhores resultados contra este

microrganismo, inibindo em concentrações de até  $0,625 \text{ mg.mL}^{-1}$ . No geral, os extratos de *Duguetia echinophora* e *Eugenia punicifolia*, apresentaram excelentes resultados contra as leveduras que são microrganismos difíceis de serem inibidos devido à estrutura da sua parede celular que apresenta quitina e 1,3- $\beta$ -glicano em sua morfologia, podendo dificultar a penetração do agente antimicrobiano (MACHADO, 2005).

Pesquisa realizada por Rodrigues (2007) utilizando extrato clorofórmico de *Miconia cabussu* Hoehne apresentaram resultados semelhantes, uma vez que dentre os micro-organismos testados, bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, a menor CIM foi demonstrada para *C. albicans*.

Os resultados apresentados pela CIM, neste estudo, demonstraram o grande potencial dos extratos vegetais da flora paraense, visto que apresentaram atividade antimicrobiana em concentrações muito baixas e contra micro-organismos de difícil inibição em relação a outros estudos encontrados na literatura científica (CELOTTO et al., 2003; RODRIGUES, 2007; FRANCESCATO et al.; 2007; SALVAGININI et al., 2008; BENFATTI et al., 2010).

Estudos realizados por AURICCHIO et al. (2007) mostraram a ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Os maiores níveis de atividade antimicrobiana foram observados frente à *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*, em que, o extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* exibiu CIM de 100 mg/mL frente a *S. choleraesuis* e de 80 mg/mL frente a *Staphylococcus aureus*. O extrato não foi ativo frente à *Escherichia coli*.

No geral, a metodologia da CIM foi mais sensível do que a difusão em poço (Tabela 6).



**Tabela 6.** Resultado da inibição de micro-organismos testados, em porcentagem, por extratos vegetais através metodologias da difusão em poço e da concentração inibitória mínima (CIM).

<b>Micro-organismos</b>	<b>DIFUSÃO EM POÇO</b>	<b>CIM</b>
<i>Escherichia coli</i> CCMB 261	31,0%	16,7%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCMB 268	31,0%	47,2%
<i>Salmonella</i> sp. CCMB 281	37,9%	66,7%
<i>Staphylococcus aureus</i> CCMB 262	62,1%	63,9%
<i>Staphylococcus aureus</i> CCMB 263	48,3%	63,9%
<i>Staphylococcus aureus</i> CCMB 285	51,7%	47,2%
<i>Bacillus cereus</i> CCMB 282	55,2%	75%
<i>Candida albicans</i> CCMB 286	44,8%	91,7%
<i>Candida albicans</i> CCMB 266	34,5%	88,9%
<i>Candida parapsilosis</i> CCMB 288	31,03%	77,8%

Os dados mostrados na tabela 6 evidenciaram que houve diferença significativa das metodologias, difusão em poço e CIM, quanto à eficiência da técnica na inibição do micro-organismo. A metodologia da CIM foi mais sensível para inibir maior número de micro-organismos, uma vez que ela evidenciou a eficiência dos extratos contra 8 dos 10 micro-organismos testados, enquanto a difusão em poço apresentou maior eficácia apenas para 2 micro-organismos, *Staphylococcus aureus* CCMB 285 e *Escherichia coli* CCMB 261 (Tabela 6). Esses resultados talvez possam ser explicados pela dificuldade de difusão do extrato no meio de cultura. Bandeira et al. (1998) *apud* Alves et al. (2008) observaram que a dificuldade de difusão de produtos naturais pode estar relacionada à sua hidrossolubilidade e à sua massa molecular.

Segundo Ostrosky et al. (2008) a CIM apresenta várias vantagens e uma delas é que esse método pode ser 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura. Para Alves et al. (2008) a CIM é considerada, frequentemente, como a melhor metodologia para a avaliação de suscetibilidade ou de resistência das bactérias aos antimicrobianos.

A CIM foi mais sensível especialmente para as leveduras, seguidas pelas bactérias Gram-positivas e as Gram-negativas (Tabela 5). Na literatura há descrição de vários métodos para demonstrar a atividade antimicrobiana dos extratos de produtos naturais, sendo que os diferentes métodos não são igualmente sensíveis (VALGAS et al., 2007; SILVEIRA et al., 2009; STOPPA et al., 2009)

Os extratos de *Croton pullei*, *Cyperus articulatus*, *Mansoa difficilis*, *Cyperus giganteus*, *Eugenia biflora*, utilizados neste trabalho, foram todos macerados em metanol e em hexano. Observou-se que extratos originados da mesma parte da planta e pertencentes à mesma espécie por serem macerados em solventes diferentes apresentaram diferenças no resultado (Tabelas 5A, 5B e 5D). Os extratos metanólicos de *Cyperus articulatus*, *Croton pullei* e *Eugenia biflora* apresentaram inibições em concentrações menores para os micro-organismos em relação aos extratos hexânicos destas espécies, em contrapartida, o extrato hexânico de *Cyperus giganteus* expressou melhores resultados do que o metanólico. O extrato metanólico de *Mansoa difficilis* apresentou melhor resultado para leveduras e para a bactéria *Bacillus cereus*, enquanto que o seu extrato hexânico para *Escherichia coli* CCMB 281, *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268 e *Staphylococcus aureus* CCMB 262 (Tabela 5B). O extrato da folha da *Eugenia patrisii* não apresentou um resultado significativo diferente do extrato de folha e galhos finos.

Através da utilização da CIM foi possível demonstrar de forma quantitativa a concentração dos extratos que inibiu cada micro-organismo, mas este teste indica apenas a concentração capaz de causar a inibição do crescimento microbiano e não identifica se a inibição foi bacteriostática ou bactericida. Para isso, foi utilizado o teste da Concentração Microbicida Mínima (CMM). O teste do CMM foi realizado através da retirada de 5 µL de todos os poços com resultados positivos do MIC, e colocados no meio de cultura AMH, em seguida incubados respeitando o tempo e a temperatura de crescimento de cada micro-organismo. Observando-se os resultados foi possível notar que 14 (38,9%) extratos apresentaram atividade microbicida até 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> contra pelo menos quatro micro-organismos testados (Tabelas 5).

Dentre as bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* CCMB 262 sofreu efeito bactericida por 15 (41,7%) dos extratos, a cepa *Staphylococcus aureus* CCMB



263 por 12 (33,3%), *Staphylococcus aureus* CCMB 285 por 13 (36,1%) e *Bacillus cereus* CCMB 282 por 18 (50%), sendo que os extratos de *Centratherum punctatum* e das folhas de *Eugenia patrisii* apresentaram atividade bactericida, em concentrações de até 0,32 mg.mL<sup>-1</sup>, frente as Gram-positivas.

As bactérias Gram-negativas sofreram uma menor influência bactericida: *E. coli* CCMB 261 sofreu efeito bactericida por 4 (11,1%) extratos, a *P. aeruginosa* CCMB 268 por 12 (33,3%) e a *Salmonella* sp. CCMB 281 por 6 (16,7%) dos extratos testados.

Estudos na literatura científica mostram que muitas das plantas com atividade antimicrobiana que já foram estudadas por diversos pesquisadores são mais ativas contra cepas de bactérias Gram-positivas (RABE; VAN, 1997; LIN et al., 1999; KELMANSON; JAGER; VAN STADEN, 2000). Os resultados de CMM do presente trabalho corroboram com estes resultados.

Na CIM as três leveduras demonstraram graus de sensibilidades diferentes, entretanto, em geral, elas foram inibidas em baixas concentrações, embora pelo CMM tenha sido observado que apenas 5 (13,9%) extratos apresentaram potencial fungicida sobre esses microrganismos (Tabelas 5).

Não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para extratos de plantas quando comparados com antibióticos padrões. Alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos conhecidos, desde que se trabalhe com uma fração já determinada (ALIGIANIS et al., 2001).

O gênero *Eugenia* pertence à família Myrtaceae, algumas espécies deste gênero ainda apresentam poucos estudos na literatura. A família Myrtaceae apresenta destaque do ponto de vista químico e farmacológico e muitas espécies desta família são úteis ao homem. O gênero *Eugenia* chama a atenção pelo seu potencial terapêutico. Vários estudos desenvolvidos com espécies deste gênero mostraram resultados promissores, como atividade antiinflamatória, antibacteriana, citotóxica e antitumoral, tripanocida, antiviral contra o vírus Epstein-barr, hipoglicemiante e estimulante da liberação de insulina, entre outros (MAGINA, 2008).

Foram encontrados dados na literatura apenas referente à atividade antibacteriana, através da CIM, do extrato metanólico de *Eugenia malaccensis* L.(LOCHER et al., 1995), do extrato metanólico de *Eugenia umbelliflora* O. Berg

(MAGINA, 2008), e da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock & S.G. Harrison, que apresentou inibição do crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (OUSSALAH et al., 2007) do extrato etanólico de *Eugenia caryophyllata* Thunb. que inibiu o crescimento de *Helicobacter pylori* (LI et al., 2005), atividade antibacteriana do extrato etanólico de folhas e frutos de *Eugenia umbelliflora* contra micro-organismos Gram-positivos, como *Staphylococcus aureus* (MACHADO et al., 2005).

As variações referentes à determinação da CIM de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL et al., 2004 ; OSTROSKY et al., 2008). Logo os resultados obtidos passam a ser influenciados pelos micro-organismos usados para realizar o teste, pelo método selecionado e pelas características de solubilidade de cada substância (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991, VALGAS et al., 2007).

Os extratos, em geral, demonstraram uma boa atividade antimicrobiana contra os micro-organismos testados, sendo que os extratos de *Miconia minutiflora*, *Eugenia patrisii*, *Eugenia biflora*, *Eugenia puniceifolia* e *Eugenia protenta*, apresentaram os melhores resultados (Tabelas 5A e 5D). Estes apresentaram amplo espectro de inibição e halos de difusão em poço, em geral, maiores do que os descritos na literatura (ALVES et al., 2008; RODRIGUES, 2007). As CIM também foram muito baixas (quanto menor a CIM maior o poder inibitório do extrato) quando comparadas à literatura (CELOTTO et al., 2003; RODRIGUES, 2007; FRANCESCATO et al.; 2007; SALVAGININI et al., 2008; BENFATTI et al., 2010).

Os extratos pertencentes às famílias Myrtaceae (*Eugenia puniceifolia* , *Eugenia patrisii*, *Eugenia biflora* e *Eugenia protenta*) e Melastomataceae (*Miconia minutiflora*) apresentaram os melhores resultados, em relação aos outros extratos contra os três tipos de micro-organismos testados (bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e

leveduras). Estudos apontam que extratos e compostos isolados de *Miconia* apresentaram atividades biológicas, tais como ação antimalárica, antitumoral, analgésico e antifúngica (ANTOUN; GERENA; MILHOUS, 1993; LI et al., 2001; ANDRADE e SILVA et al, 2002). O gênero *Eugenia* também é apontado na literatura como responsável por atividade anti-inflamatória, antibacteriana, citotóxica e antitumoral, tripanocida, antiviral contra o vírus Epstein-barr, hipoglicemiante e estimulante da liberação de insulina, entre outros (MAGINA, 2008).

Os resultados iniciais encontrados neste trabalho demonstram o potencial emprego dessas espécies no estudo de produtos naturais antibióticos.

### 5.3 TRIAGEM FITOQUÍMICA

Dos vegetais são extraídas várias substâncias, e grande parte delas responsáveis pela aplicabilidade na alimentação e na saúde. Isto tem sido estímulo ao desenvolvimento do estudo de muitas plantas, dentro do âmbito da química orgânica, objetivando o estudo das estruturas e da química destes compostos que é extremamente ampla e diversificada (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010).

Visando ao levantamento dos principais metabólitos constituintes que poderiam ser os responsáveis pela atividade biológica analisada, utilizou-se a técnica de análise cromatográfica em camada delgada, nos extratos metanólicos que apresentaram melhores resultados nos testes de atividade antimicrobiana, de acordo com os métodos propostos por HARBORNE (1998).

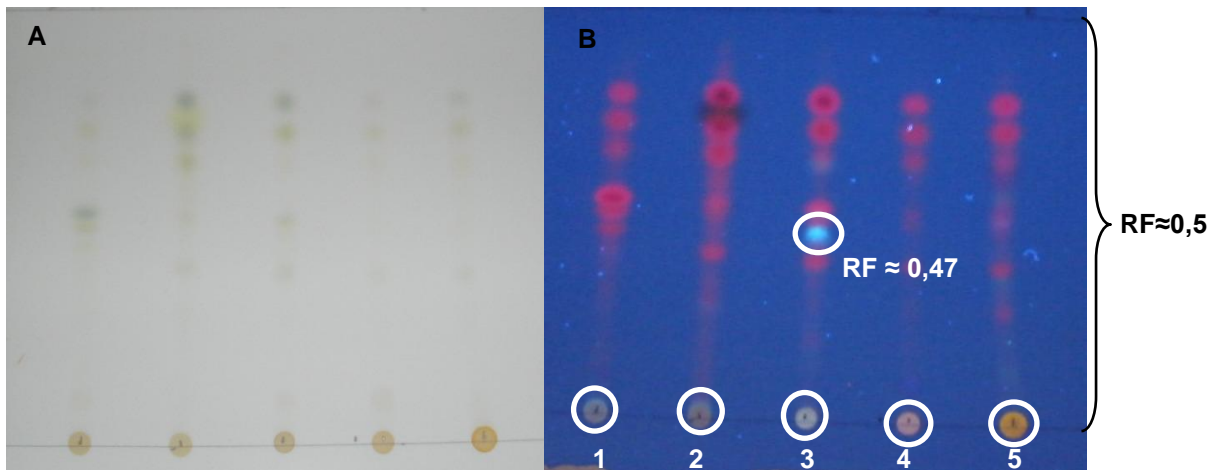
A pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos das espécies vegetais ou avaliar sua presença nos mesmos de modo que, a análise fitoquímica pode identificar os grupos de metabólitos secundários relevantes (SIMÕES, 2007).

A fim de determinar as classes de metabólitos secundários presentes foi realizada a cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos que apresentaram os melhores resultados antimicrobianos (*Miconia minutiflora*, *Eugenia protenta*, *Eugenia patrisii*, *Eugenia puniceifolia*, *Eugenia biflora*), utilizando reveladores para visualização de terpenos e esteróides (Reagente Anisaldeído Ácido Sulfúrico AS), de alcaloides (Reagente Dragendorff com Ácido Clorídrico DRG), de triterpenos e esteroides (Reagente Liebermann Burchard LB), de cumarinas (Reagente Hidróxido de Potássio KOH) e flavonóides (Reagente Produtos Naturais Polietilenoglicol NP/ PEG). Os resultados da triagem fitoquímica estão expressos na Tabela 7.

**Tabela 7.** Resultado da triagem fitoquímica dos extratos metanólicos de *Miconia minutiflora*, *Eugenia protenta*, *Eugenia patrisii*, *Eugenia puniceifolia* e *Eugenia biflora*.

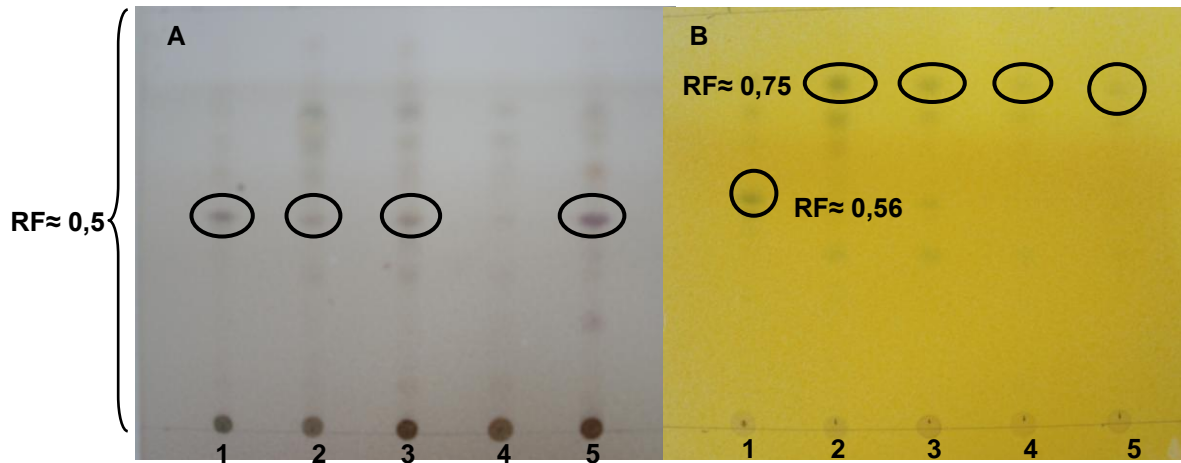
ESPÉCIES VEGETAIS	EXTRATO	KOH	DRG	NP/ PEG	AS	LB
		Antraquinonas Cumarinas	Alcalóides	Flavonóides	Terpenos Esteróides	Triterpenos Esteróides
<i>Miconia minutiflora</i>	Folha/MeOH	-	+	+	+	+
<i>Eugenia protenta</i>	Folha/MeOH	-	+	+	+	+
<i>Eugenia patrisii</i>	Folha e caule/MeOH	-	+	+	+	+
<i>Eugenia puniceifolia</i>	Folha/MeOH	-	+	+	+	+
<i>Eugenia biflora</i>	Folha/MeOH	-	+	+	+	+

(+) presença das classes de compostos relacionadas ao reagente; (-) ausência da classe de composto relacionada ao reagente.



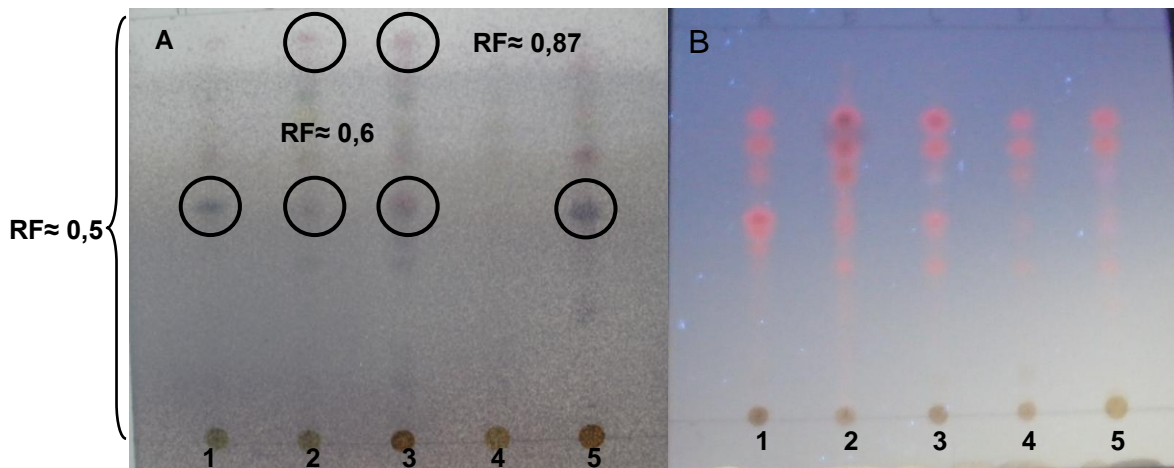
**Figura 12:** Cromatoplasmas dos extratos das espécies: 1- *Miconia minutiflora*, 2- *Eugenia protenta*; 3- *Eugenia patrisii*; 4- *Eugenia puniceifolia* e 5- *Eugenia biflora*, da esquerda para direita. (A) Tratamento com Reagente NP/PEG à luz visível e (B) Tratamento com Reagente produtos Naturais NP/PEG à luz UV365. **Foto:** Araújo (2010).

Na Figura 12A e 12B, o tratamento com Reagente Produtos Naturais NP/PEG todas as origens de aplicação das amostras intensificaram a fluorescência após a aplicação deste reagente e visualização em luz UV365 nm, também pode ser indicativo de flavonóides o para amostra 3 na Figura 12B (WAGNER; BLADT, 1995).



**Figura 13:** Cromatoplas das extratos das espécies: 1- *Miconia minutiflora*, 2- *Eugenia protenta*; 3- *Eugenia patrisii*; 4- *Eugenia puniceifolia* e 5- *Eugenia biflora*, da esquerda para direita. (A) Tratamento com Reagente LB à luz visível e (B) Tratamento com Reagente DRG.  
Foto: Araújo (2010).

Na Figura 13A o tratamento com Reagente LB à luz visível, apresentou indicativo de triterpenos/esteróides, após aplicação do reagente e aquecimento a 100°C por 10 minutos houve o aparecimento notável de zonas marrons nas amostras A,B,C e E com  $RF \approx 0,5$  a cinza por essas amostras, assim como, manchas claras cinzas, com  $RF \approx 0,62$ , distribuída sobre toda a amostra 4. O tratamento com Reagente DRG (Figura 13B) detectou a presença de alcalóides nos extratos, na amostra 1 com  $RF \approx 0,56$ ; 2, 3, 4 e 5 com  $RF \approx 0,75$ ; a presença pode ser notada pela presença da coloração marrom após aplicação do mesmo à luz visível.



**Figura 14:** Cromatoplaças dos extratos das espécies: 1- *Miconia minutiflora*, 2- *Eugenia protenta*; 3- *Eugenia patrisii*; 4- *Eugenia puniceifolia* e 5- *Eugenia biflora*, da esquerda para direita. (A) Tratamento com Reagente AS à luz visível. (B) Tratamento com Reagente KOH à luz UV365 nm. **Foto:** Araújo (2010).

A figura 14A com tratamento com Reagente AS, apresentou indicativo de terpenos/esteróides à luz visível, após aplicação do reagente e aquecimento a 100°C por 10 minutos, evidenciado pela presença de zonas típicas desta classe de compostos por toda a placa. As colorações das zonas variaram de azul (com  $RF \approx 0,6$  na amostra 1, 2, 3 e 5) a violeta (com  $RF \approx 0,87$  nas amostra 2 e 3 por exemplo), bem como manchas rosas podendo ser indicio de esteróides e (WAGNER; BLADT, 1995). A Figura 14B, tratamento com reagente KOH, não evidenciou o aparecimento de zonas fluorescentes azuladas, indicativo de cumarinas, e após aplicação do reagente à luz UV 365 nm não houve zonas amareladas como indicativo de antranas segundo Wagner e Bladt (1995), a condição permaneceu a mesma antes e após a aplicação do reagente.

Considerando os resultados dos reveladores químicos, apresentados na Tabela 7, é possível sugerir a presença de terpenos, esteróides, alcalóides, triterpenos, flavonóides nas espécies testadas.

Os compostos fenólicos detectados neste trabalho, como flavonóides, estão de acordo com a composição química indicada na literatura. Segundo Einbond et al. (2004), o gênero *Eugenia* é bastante rico em compostos fenólicos, por isso as espécies do gênero *Eugenia* apresentam atividade antioxidante, relacionada a estes compostos. Além de compostos fenólicos, foram descritos para o gênero *Eugenia* compostos

derivados do metabolismo dos terpenos, como os triterpenos e esteróides (LUNARDI et al., 2001; AZEVEDO-MELEIRO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004), confirmando os resultados encontrados neste trabalho.

A resposta positiva para alcalóides nos extratos do gênero *Eugenia* foi um resultado inesperado, uma vez que trabalhos realizado por Magina (2008) citam a sua ausência, no entanto a ausência de antraquinonas e cumarinas demonstradas no presente trabalho nas espécies de *Eugenia* estão de acordo com os resultados encontrados para o gênero *Eugenia* por Magina (2008).

A presença de flavonóides em uma espécie do gênero *Miconia* foi estudada por Rodrigues et al. (2006), assim como a presença de terpenos, triterpenos que podem ser um dos responsáveis, segundo Rodrigues (2007), pela elevada atividade antimicrobiana apresentada pelas espécies deste gênero. Gunatilaka et al. (2001) e Cunha et al. (2003), detectaram a presença de triterpenos e cumarinas em *Miconia ligustroides* (DC.) Naudin.

Embora nas amostras analisadas, não se possa apontar ainda qual o(s) composto(s) responsável(is) pela atividade antimicrobiana, pois estudos posteriores de isolamento e identificação dos princípios ativos são necessários, é possível indicar estas espécies para estudos químicos e biológicos mais específicos devido à excelente ação antimicrobiana observada e pela presença de metabólitos potencialmente ativos.



## 6 CONCLUSÕES

- Os extratos das espécies vegetais estudadas apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias e leveduras testadas, com variações nos resultados de acordo com as partes da planta de origem do extrato, tipo de micro-organismo e metodologia empregada para a avaliação;
- É possível sugerir pesquisas direcionadas a isolar compostos, avaliar quimicamente e realizar atividade antimicrobiana dos compostos pertencente aos extratos das folhas de *Centratherum punctatum* e das folhas de *Eugenia patrisii* frente às bactérias Gram-positivas; extratos metanólicos de *Duguetia marcgraviana* e *Eugenia puniceifolia* contra *Candida albicans* e a *Candida parapsilosis* e do extrato hexânico de *Cyperus giganteus* contra *Candida albicans*;
- Na CIM os microrganismos testados apresentaram maior sensibilidade, com destaque para as leveduras;
- Os resultados obtidos neste trabalho apontam a CIM como uma técnica eficiente para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos vegetais;
- Os extratos de *Miconia minutiflora*, *Eugenia patrisii*, *Eugenia biflora*, *Eugenia puniceifolia* e *Eugenia protenta*, destacaram-se pela presença de potente atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos testados e em concentrações inibitórias mínimas muito baixas e, por isso, outros estudos da constituição química e atividades biológicas devem ser realizados;
- Torna-se necessário a realização de estudos de populações das espécies *Miconia minutiflora*, *Eugenia patrisii*, *Eugenia biflora*, *Eugenia puniceifolia* e *Eugenia protenta*;

- É possível sugerir a presença de terpenos, esteróides, alcalóides, triterpenos, flavonóides nas espécies *Miconia minutiflora*, *Eugenia patrisii*, *Eugenia biflora*, *Eugenia puniceifolia* e *Eugenia protenta*;
- Os resultados, da difusão em poço e da CIM, encontrados nesta pesquisa foram melhores do que os resultados encontrados na literatura.
- Este é o primeiro trabalho na literatura sobre a atividade antimicrobiana *in vitro* de vinte e quatro espécies de plantas aromáticas do Pará e contribui para ampliação do conhecimento científico sobre a atividade antimicrobiana de plantas da biodiversidade amazônica, além de agregar valor a produtos dessa biodiversidade. Porém outros trabalhos deverão ser realizados para a complementação destes estudos e aplicações, com isolamento dos possíveis agentes antimicrobianos.

## 7 REFERÊNCIAS

ADWAN, G. et al. Antibacterial effects of nutraceutical plants growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa*. **Turk J. of Biology**. v. 30, p. 239-242, 2006.

ALIGIANIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem.** v. 49, p. 4168-4170, 2001.

ALVAREZ, C.; LABARCA, J.; SALLES, M. Estratégias de prevenção de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) na América Latina. **Braz. J. Infect. Disv.** v. 14, n. 2, p.108-120, 2010.

ALVES T.M.A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 95, p. 367-373, 2000.

ALVES, T.M. et al. Polygodial, the fungitoxic component from the Brazilian medicinal plant *Polygonum punctatum*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 831-833, 2001.

ALVES, E.G. et al. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quím. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens, **J. Ethnopharmacol.** v. 74, p.113-125, 2001.

ANDERSON K.L. Is bacterial resistance to antibiotic an appropriate example of evolutionary change? **CRSQ.** v. 41, p. 318-326, 2005.

ANDRADE e SILVA, M.L. et al. Evaluation of the analgesic activity of an ethanol extract of *Miconia fallax*. **Boll. Chim. Farmac.**, v. 141, p. 158-160, 2002.

ANGNES, S.I.D. **Isolamento, caracterização química e avaliação da propriedade inseticida do óleo essencial de *Piper amplum* Kunth**. 2005. 88f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Regional de Blumenau-SC.

ANTOUN, M.K.; GERENA, L.; MILHOUS, W.K. Screening of the flora of Porto Rico for potential antimalarial bioactives. **Intern. J. Pharmacog.**, v. 4, p. 255-258, 1993.

ARDURA, M.I. *Staphylococcus aureus*: Vieja bacteria con nuevos trucos. **Rev. Chil. Infect.** v. 26, n. 5, p. 401-402, 2009.

AURICCHIO M. T. et al. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**. V. 26, n. 1, p. 76-82, 2007

AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **J. Food Compos. Anal.**, v. 17, p. 385–396, 2004.

BAKER, C.N.; TENOVER, F.C. Evaluation of alamar colorimetric broth microdilution susceptibility testing method for staphylococci and enterococci. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 11, p. 2654-2659, 1996.

BANDEIRA, M. F. C. L. et al. **J. Bras. Clin. Est. Odontol.** **1998**. In: ALVES, E.G. et al. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quím. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T.L.G.; SANTOS, H.S. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *Protium heptaphyllum*. In: 46º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, **Resumos**, Salvador-BA: ABQ, 2006.

BARATTO, L. et al. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 18, n. 4, p. 577-582, 2008.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quím. Nova.** v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BATISH, D.R. et al. Nature of interference potential of leaf debris of *Ageratum conyzoides*. **Plant Growth Regul.** v. 57, p. 137–144, 2009.

BELOTTI, V.; BARROS, M. de A. F.; NERO, L. A. Frequency of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. **Rev. Microbiol.**, v. 30, p. 137-140, 1999.

BENFATTI, C.S. et al. Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp frente a cepas de mollicutes. **Rev. Pan-Amaz Saude**; v.1, n. 2, p. 33-39, 2010.

BERTUCCI, A., et al. Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay River. **Braz. J. Pharmacogn.** V. 19, p. 20-25, 2009.

BLACK, J.G. Microbiologia: fundamentos e perspectivas. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 829 p..

BOMONO R.A.; SZABO D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species, *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin. Infect. Dis.** v. 43, p. 49-56, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa nacional de Plantas medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF, 2007. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/politica\\_plantas\\_medicinais\\_fitoterapia.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/politica_plantas_medicinais_fitoterapia.pdf). Acessado em: 21.out.2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c13443804478bef68eefcf7d15359461/resolucao+antibioticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em: 04.nov.2010.

BRIZUELA, M. A. et al. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios (Revisión). **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 15, p. 69-74, 1998.

BROOKS, G. F. et al. Microbiologia Médica. 24 ed. São Paulo. Mcgraw Hill Interamericana do Brasil. 2008. 653p.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciênc. Cult**, v. 55, n. 3, São Paulo, 2003.

CALDERON, L.A. et al. **Amazonian biodiversity**: a view of drug development for leishmaniasis and malaria. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 20, n. 6, p. 1001-1023, 2009.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd. 480 p. 2004.

CATÃO, R.M.R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. **RBAC**, v. 37, n. 4, p. 247-249, 2005.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quím. Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CELOTTO, A.C. et al. Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. **Braz. J. Microbiol.** v. 34, p. 339-340, 2003.

CENTRO DE GESTÃO DE ESTUDOS ESTRATÉGICOS – CGEE. Sub-rede de dermocosméticos na Amazônia a partir do uso sustentável de sua biodiversidade com enfoques para as cadeias produtivas da: Castanha-do-pará e dos óleos de andiroba e copaíba. Produto 1: Mapeamento e diagnóstico das possibilidades, dos desafios e das oportunidades para a estruturação da Sub-Rede de Dermocosméticos da Amazônia. Brasília, Dezembro, 2007.

CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprovada – Segunda Edição. CLSI document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos. 2002.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. 2003a.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**;

Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. 2003b.

COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a postantimicrobial era. **Science**, v. 257, p. 1050-1055, 1992.

COLE, M.D. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays-a critical review. **Biochem. System. Ecol.**, v. 22, n. 8, p. 837-856, 1994.

COUTINHO, H.D.M. et al. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Conceitos**, p. 77-85, 2003/2004

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 564–582, 1999.

CRESSEY, D. Disaster Doctors May Be Using the Wrong Drugs. **Nature News**, 2010. Disponível em: <http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=disaster-doctors-may-be-using->. Acessado em: 28.dez.2010.

CRISAN, I. et al. Natural propolis extract NIVCRISOL in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. **Rom. J. Virol.**, v. 46, n. 3-4, p. 115-33, 1995.

CUNHA, W.R et al. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 84, n. 2, p. 47-49, 2003.

DAVIS, B.D. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 51, p. 341-350, 1987.



DEMAIN, A.L. Indiolites from microorganisms: a brilliant past, a bright future. In: LUIJENDIJK, T.J.C. Ed. **2000 Years of Natural Products Research Past, Present and Future**. 1ª e.d. Leiden: Phytoconsult, p. 119-136, 2000.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. London: John Wiley & Sons, 2002.

DUARTE, M.C.T. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, supl. 01, p. 06-08, 2004.

DUARTE, M.C.T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Construindo a história dos produtos naturais. **Multiciência**. v.7, 2006.

EINBOND, L.S. et al. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chem.**, v. 84, p. 23-28, 2004.

FENNEL, C.W. et al. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 205-217, 2004.

FERREIRA, B.L.A. **Identificação da atividade antibiótica e relação estrutura-atividade de moléculas de origem sintética e animal**. 2007. 110f. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) - Universidade Federal Fluminense, Niterói.

FRANCESCATO, L.M. et al. Atividade antimicrobiana de *Senecio heterotrichius* D.C. (Asteraceae). **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.**, v. 43, n, 2, p. 239-245, 2007.

FREITAS, C.C. Como as penicilinas (e outros beta-lactâmicos) matam e lisam as bactérias. **Ciênc. Cult.**, v. 35, p. 1121-30; 1989.

GALES, A.C., REIS, A.O.; JONES, R.N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 1, p. 183-190, 2001.

GOMES, L.P. et al. *Bacillus cereus* em amostras de doces industrializados comercializados por ambulantes nos municípios de Seropédica e Itaguaí. **Rev. Univ. Rural**, v. 24, n. 2, p.181-184, 2004.

GOODMAN, G. A. et al. As bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: McGrawHill, 2003. 2148 p.

GULLECE, M. et al. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderian*. **Phytomedicine**, v. 13, p. 515-521, 2006.

GUNATILAKA, A.A.L. et al. Isolation, synthesis and structure-activity relationships of bioactive benzoquinones from *Miconia lepidota* from the Suriname rainforest. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 2-5, 2001.

HAIDA, K.S. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq. Cienc. Saude Unipar**, v. 11, p. 185-192, 2007.

HARBORNE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry**. 3 ed. London: Academic Press, 1988.

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. **Drug discovery today**, v.13, n.19/20, p. 894-901,2008.

HELANDER, I.M. et al. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-Negative bacteria. *In*: DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Construindo a História dos produtos naturais. **Multiciência**. v.7, 2006.

HERSCHLER, R.J. United States Patent Office: Enhancing tissue penetration of physiologically active agents with DMSO. Disponível em:  
<<http://www.freepatentsonline.com/3711606.pdf> /Acessado em: 18 jul. 2010.

HOEFEL, R. et al. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. **Bol. Farmacot.**, v. 11, p. 1-4, 2006.

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p.1027-1031, 2002.

HOOPER D.C. Pumps, nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiology. **Clin. Infect. Dis.**, v. 40, p.1811-1817, 2005.

HOPKINS, M.I.J.G. Modelling the known and unknown plant biodiversity of the Amazon Basin. **J. Biogeography**, v. 34, n. 8, p. 1400-1411, 2007.

HULLIN, V. et. al. – Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. **Sciences des Aliments** v.18 p.563-582, 1998.

JACOBY G.A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clin. Infect. Dis.**, v. 41, p. 120-26, 2005.

KAMBIJ, A.; SALUJA, A.K. *Ageratum conyzoides* L.: A review on its phytochemical and pharmacological profile. **Int. J. Green Pharm.**, v. 2, p. 59-68, 2008.

KELMANSON, J.E.; JAGER, A.K.; VAN STADEN, J. Zulu medicinal plants with antibacterial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 69, p. 241-246, 2000.

KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 5ª ed., Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 1465.

KUHNER, D.; MARQUES, A. O desafio do controle da resistência a antimicrobianos nos hospitais. **Prática Hospitalar**, n. 28, 2003.

KUTCHAN, T.M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant. Physiology**, v. 125, p. 58-60, 2001.

LABARCA J.L. Nuevos conceptos en farmacodinâmica, debemos repensar cómo administramos antimicrobianos? **Rev. Chilena Infectol.**, v. 19, supl. 1, p. 33-37, 2002.

LAHLOU, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. **Phytother. Res.**, v.18, n. 6, p. 435-448, 2004.

LI, X.-C. et al. Phenolic compounds from *Miconia myriantha* inhibiting *Candida* Aspartic proteases. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 1282-1285, 2001.

LI, Y. et al. In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. **J. Ethnopharmacol.**, v. 98, n. 3, p. 329-333, 2005.

LIMA, E.O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos. p. 481501. 2001.

LIN, J. et al. Preliminary screening of some tradicional Zulu medicinal plants for anti-inflammatory and anti-microbial activities. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, p. 267-274, 1999.

LOCHER, C.P. et al. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 49, n. 17, p. 23-32, 1995.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England J. Medic.**, v. 339, p. 520-532, 1998.

LUNARDI, I. et al. Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 12, n. 2, p. 180-183, 2001.

MACHADO, K.E. et al. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharm Biol.** v. 43, n. 7, p. 636-639, 2005.

MACHADO, K.E. **Atividade antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias isoladas da *Eugenia umbelliflora* Berg.** 2005. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Vale do Itajaí, 2005.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**, 12<sup>a</sup> ed. São Paulo: Artmed, 2010. 1128 p.

MAHESH, B.; SATISH, S. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. **World J. Agric. Sci.**, v. 4, p. 839-843, 2008.

MAGINA, M.D.A. **Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero *Eugenia***. 2008. 199 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MATIAS, E.F.F. et al. Atividade antibacteriana *In vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **R. Bras. Bioci.** v. 8, n. 3, p. 294-298, 2010.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. 1 ed. São Paulo: Ed. Robe, 1999. 116 p.

MIN, L.I. et al. Gram positive three-component antimicrobial peptidesensing system. **PNAS**, v. 104, p. 9469-9474, 2007.

MIRANDA, E.T. et al. Epidemiologia de candidíase hospitalar: importância da identificação específica. **Rev. Ciên. Farm.**, v. 24, n. 1, p. 39-45, 2003.

MITTERMEIER, R. A. et al. Wilderness and biodiversity conservation. In: **PNAS**, v.100, n.18, p. 10309-10313.

MOREIRA L.B. Princípios para uso racional de antimicrobianos. (2004) In: SILVA, C.V. **et al.** Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 20, nº 3, p. 355-360, 2010.

NASCIMENTO, G.G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, n. 2, p. 247–256, 2000.

NASCIMENTO, J.E. et al. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n. 2, p. 145-150, 2008.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª ed. Porto Alegre: Ed. Universidade UFRGS; Ed. UFSC, 2000. p. 11-24.

NORRBY, S.R.; NORD, C.E. FINCH, R. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. **Lancet Infect Dis.**, v. 5, p. 115-119, 2005.

NUNES, X.P. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 16, p. 642-644, 2006.

OKUNADE, A.L.; ELVIN-LEWIS, M.P.F.; LEWIS, W.H. Natural antimycobacterial metabolites: current status. **Phytochem.**, v. 65, p. 1017-1032, 2004.

OLIVEIRA D. G., et al.. Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. **J. Basic Appl Pharm Scie**, v. 28, p. 165-169, 2007.

OPLUSTIL, C.P. et al. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. São Paulo: Sarvier, 2000.

ORLANDO, S.C. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Extrato Hidralcoólico Bruto da Casca do *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão).**

2005. 88 f. Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde) - Universidade de Franca, Franca, SP.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 18, p. 301-307, 2008.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, p. 414 - 420, 2007.

PEREIRA, A.S.; AQUINO-NETO, F.R. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. **Quím. Nova**, v. 23, n. 3, p. 370-380, 2000.

PFALLER, M.A.; BARRY, A.L. Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 8, p. 1992-1996, 1994.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA M.T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 325p.

RABE, T.; VAN, S.J. Antibacterial activity of *S. cuminii* and *S. travancoricum* leaf essential oils. **Fitoterapia**, v. 73, p. 414-416, 1997.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Farmacologia. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 703 p.



RAUHA, J.P. et al. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **Intern. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 3-12, 2000.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; CURTIS, H. *Biologia Vegetal*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 906 p.

REIS, M.O.R. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico das folhas de *Persea gratissima* Gaertn – Abacateriro (Lauraceae). 2006. 76 f. Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde). Universidade de Franca, Franca-SP.

REIS, M.S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. 2004 In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Orgs.) **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. da UFSC / UFRGS, 2007. p. 46-74.

RESCHKE, A.; MARQUES, L.M.; MAYWORM, M.A.S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

RIBEIRO, M.G.; CARVALHO-FILHO, A.S.; LISTONI, F.J.P. Dimetilsulfóxido - DMSO no teste de sensibilidade microbiana *in vitro* em cepas de *Rhodococcus equi* isoladas de afecções pulmonares em potros. **Ciência Rural**, v.31, n.5, p.889-892, 2001.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J.P.V.; DANTAS-BARROS, A.M. Perfil da utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob influência da legislação nacional. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 1, p. 65-70, 2005.

RICARDO, S.B. Elevação de MIC para a vancomicina no *S. aureus*. **Prática Hospitalar**. Ano X, n. 60, p. 46-48, 2008.

RIOS, J.L.; RECIO M.C.; VILLAR A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **J. Ethnopharmacol.**, v. 23, p. 127-149, 1988.

RIOS, J.L.; RECÍO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 80–84, 2005.

RISSATO, S.; ALMEIDA, M.V.; SILVA, L.C. Estudo do óleo essencial de *Eugenia uniflora* como subsídio para aplicação como fitofármaco. **Salusvita**, v. 23, n. 2, p. 209-222, 2004.

RIVERO, S. A. et al. Diversidad florística medicinal y potencial etnofarmacológico de las plantas de Los Valles Secos de Cochabamba -Bolivia. **Rev. Bol. Ecol.** v. 12, p. 53-85, 2002.

RODRIGUES, J. et al. Constituintes químicos isolados das folhas de *Miconia cabucu* Hoehne (Melastomataceae). In: 29ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Resumos, 2006, Águas de Lindóia-SP.

RODRIGUES, J. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Miconia* spp.** 2007. 157 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.

SADER, H.S. et al. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros – Resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. **J. Pneumol**, v. 27, n. 2, 2001.

SALVAGININI, L.E. et al. Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 8, n. 2, p. 241-244, 2008.

SANDES, A.R.R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e Diversidade Química e Genética. **Biotecnologia**, n.13. p. 28-32, 2000.

SANTANA, M.L. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de espécies de plantas da Amazônia: *Guatteria poeppigiana* (Annonaceae), *Renealmia* sp. (Zingiberaceae), *Siparuna guianensis* (Monimiaceae), *Myrciaria tenella* e *Calycolpus goetheanus* (Myrtaceae), *Philodendron imbe* (Araceae), *Virola calophylla* (Myristicaceae) e *Piper hispidum* (Piperaceae). In. III SEMINÁRIO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA E II SEMINÁRIO DE RESISTÊNCIA MICROBIANA, 2008, Salvador. **Resumos** . Salvador, 2008.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2003. p. 403-434.

SANTOS, M. H. et. al. Um espalhador de baixo custo de fase estacionária em placas para cromatografia em camada delgada. **Quím. Nova**, v. 30, n. 7, p. 1747-1749, 2007.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SARTORI, M.R.K. Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores de *Acmela brasiliensis* Spreng. (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae). 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC.

SEJAS, L.M. et al. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 27-35, 2003.

SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal proteins. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 7, p. 2883-2894, 2001.

SHINOHARA, N.K.S. et al. *Salmonella* sp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciênc. Saúde Coletiva**. v.13, n. 5, 2008.

SILVA, J.M.C.; RYLANDS, A.B.; FONSECA, G.A.B. O destino das áreas de endemismo da Amazônia. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 124-132, 2005.

SILVA, C.V. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 3, p. 355-360, 2010.

SILVA, N.L.A.; MIRANDA, F.A.A.; CONCEIÇÃO, G.M. Triagem fitoquímica de plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia plena**, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010.

SILVEIRA, L.M.S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.** v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2007.

SOFIATI, F. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas preliminares de extratos de *Polygonum acre* (Polygonaceae) H.B.K. e *Synadenium carinatum* Boiss. (Euphorbiaceae)**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.

STOPPA, M.A. et al. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Quím. Nova**, v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.

TADEG, H. et al. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 168-175, 2005.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TEMPONE A.G. et al. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 443-449, 2008.

TOLEDO, A.C.O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Rev. Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 827p.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 386 p.

TRIAS, J.; GORDON, E.M. Innovative approaches to novel antibacterial drug discovery. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 8, p. 757-762, 1997.

UETANABARO, A.P.T.; GÓES-NETO, A. Segurança alimentar: transferência horizontal de genes e alimentos transgênicos. **Sitientibus**, v. 35, p. 111-124, 2006.

VALGAS, C. et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, p. 369-380, 2007.

VALLILO, M.I. et al. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg - Myrtaceae. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, p. 231-237, 2008.

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.D. (Eds.). **Methods in Plant Biochemistry**. London: Academic Press, 1991. p. 47-69.

VAN ASSETT G.J. Penicillin tolerance, treatment failure in Group A streptococcal pharyngotonsillitis. **Eur. J. Clin. Infect. Dis.**, v. 15, p. 107-115, 1996.

VARGAS, A.C. et al. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcoólico de própolis. **Ciênc. Rural**, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. O gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Quím. Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VIEIRA, G.R.T. **Otimização das condições de cultivo de *Polyporus tricholoma* Mont. visando à produção de substâncias antibacterianas**. 2005. 120f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2005.

VIEIRA, I. C. G.; SILVA J. M. C.; TOLEDO P. M. Estratégias para evitar a perda de biodiversidade na Amazônia. **Estudos Avançados**. v. 54, n. 19, p. 153- 164, 2005.

VIRTUOSO, S. et al. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 15, n. 2, p. 137-142, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer Verlag, 1995. 384p.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal.** Chapecó: Argos, 2001. p. 47-75.

ZOGHBI, M.G.B. et al. Essential oils of *Siparuna guianensis* Aubl. **J. Essent. Oil Res.**, v. 10, p. 543-546, 1998.